

# **Funktionelle Analyse der Phytochrome Cph1 und Cph2 von *Synechocystis* sp. PCC 6803**

## **DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Diplom-Biologin Brita Fiedler  
geboren am 05.11.1973 in Dresden

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:  
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner  
2. Prof. Dr. Hendrik Schubert  
3. PD Dr. Tilman Lamparter

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2004

## Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der beiden cyanobakteriellen Phytochrome Cph1 und Cph2 untersucht. Dafür wurde zunächst das Wachstum von Mutanten mit einem inaktivierten *cph1*- bzw. *cph2*-Gen unter verschiedenen Lichtbedingungen analysiert. Das Wachstum aller Phytochrommutanten war unter Starklicht beeinträchtigt. Dahingegen wuchs die *cph1*-Mutante im FRL schlechter als der Wildtyp, während das Wachstum der *cph2*-Mutante im RL vermindert war. Eine *cph1/cph2*-Doppelmutante zeigte unter allen Lichtbedingungen eine Wachstumsreduktion, die der jeweiligen Einzelmutante ähnlich war. Die genaue Ursache für die Beeinträchtigung des Wachstums der Phytochrommutanten konnte nicht ermittelt werden. Die verschiedenen Aspekte der Photosynthese, wie Pigmentzusammensetzung, maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates und 77K-Fluoreszenzemission, waren in den Phytochrommutanten nicht signifikant verändert.

Bei *Synechocystis* sp. PCC 6803 konnte eine lichtgerichtete Bewegung beobachtet werden, wobei man aufgrund von Aktionsspektren der Motilität eine Funktion der Phytochrome oder phytochromähnlichen Proteine bei der Steuerung der phototaktischen Bewegung vermutet. Dem Cph1-Protein konnte hierfür keine Rolle zugeordnet werden. Dahingegen scheint der Photorezeptor Cph2 die lichtgerichtete Bewegung der Zellen in Richtung einer Blaulichtquelle zu inhibieren. Eine Interaktion mit einem klassischen BL-Rezeptor konnte ausgeschlossen werden.

Schlagwörter:

Phytochrom

Cyanobakterien

*Synechocystis* sp. PCC 6803

Phototaxis

## Abstract

The function of the cyanobacterial phytochromes Cph1 and Cph2 was investigated. At first, the growth of mutants with an inactivated *cph1* or *cph2* gene was analysed under different light conditions. The growth of all phytochrome mutants was affected under high-light conditions. However, the *cph1*<sup>-</sup> mutant grew slower than the wild type in far-red light, whilst the *cph2*<sup>-</sup> mutant revealed a reduced growth under red light conditions. A decreased growth of the *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> double mutant was observed under all light conditions with a growth rate similar to the corresponding single mutant. The exact reason for the growth impairment of the phytochrome mutants could not be ascertained. Different aspects of photosynthesis (pigment composition, maximal net-oxygen evolution and 77K fluorescence emission) were not changed significantly in the phytochrome mutants.

*Synechocystis* sp. PCC 6803 shows a movement towards a light source. Based on action spectra of motility phytochromes and phytochrome-like proteins are supposed to have a function in regulating the phototactic movement. An influence of the Cph1 protein in the phototactic movement was not demonstrated. Whereas, the Cph2 protein seems to be involved in the inhibition of the cell movement towards blue light. An interaction with a typical blue-light receptor was excluded.

Keywords:

phytochrome

cyanobacteria

*Synechocystis* sp. PCC 6803

phototaxis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
Zusammenfassung .....	VIII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Photorezeptoren in Pflanzen.....	1
1.2 Die pflanzlichen Phytochrome .....	1
1.2.1 Molekulare Eigenschaften des Phytochroms .....	2
1.2.2 Intrazelluläre Lokalisation.....	5
1.2.3 Signaltransduktionswege.....	6
1.3 Die Entdeckung von phytochromähnlichen Proteinen in <i>Synechocystis</i> .....	8
1.3.1 Das cyanobakterielle Phytochrom 1 (Cph1) .....	9
1.3.2 Das cyanobakterielle Phytochrom 2 (Cph2) .....	11
1.3.3 Phytochromähnliche Proteine in <i>Synechocystis</i> .....	14
1.4 Die BL-Rezeptoren .....	17
1.5 Die lichtinduzierte Motilität .....	21
1.6 Zielstellung .....	22
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1 Material .....	24
2.1.1 Chemikalien .....	24
2.1.2 Radiochemikalien.....	25
2.1.3 Enzyme.....	25
2.1.4 Nukleinsäuren.....	26
2.1.5 Kits .....	29
2.1.6 Filter und Membranen .....	29
2.1.7 Technische Geräte .....	29
2.1.8 Verwendete Bakterienstämme.....	31
2.1.8.1 Stämme von <i>Synechocystis</i> .....	31
2.1.8.2 Stämme von <i>E. coli</i> .....	33
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen.....	33
2.2.2 Konstruktion von Mutanten in <i>Synechocystis</i> .....	34
2.2.2.1 Allgemeine Methoden .....	34
2.2.2.2 Konstruktion von Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese .....	35

2.2.2.3	Erstellen einer Mini-Genbank .....	36
2.2.2.4	Transformation von <i>Synechocystis</i> .....	36
2.2.2.5	Konjugation .....	37
2.2.3	Isolation von Nukleinsäuren .....	37
2.2.3.1	Isolation der Gesamt-DNA aus <i>Synechocystis</i> .....	37
2.2.3.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> und <i>Synechocystis</i> .....	38
2.2.3.3	Präparation von RNA aus <i>Synechocystis</i> .....	39
2.2.3.4	Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäure- Konzentrationen .....	40
2.2.4	Analyse von Nukleinsäuren .....	40
2.2.4.1	DNA-Sequenzierung .....	40
2.2.4.2	Markierung von DNA-Sonden .....	40
2.2.4.3	Southern-Blot-Analyse .....	41
2.2.4.4	Koloniehybridisierung .....	42
2.2.4.5	Northern-Blot-Analyse .....	42
2.2.4.6	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR .....	43
2.2.5	Wachstumsanalyse .....	44
2.2.5.1	Kultivierungsbedingungen .....	44
2.2.5.2	Berechnung der Wachstumsrate .....	45
2.2.5.3	Kompetitionsexperimente .....	45
2.2.5.4	Bestimmung von Photosyntheseparametern .....	46
2.2.6	Untersuchung der Phototaxis .....	49
2.2.6.1	Phototaxis-Assay .....	49
2.2.6.2	Aufnahme eines Aktionsspektrums der BL-gesteuerten Motilität .....	50
2.2.6.3	Untersuchung der TypIV-Pili mittels Transmissionselektronenmikroskopie .....	51
2.2.7	Computeranwendungen .....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>53</b>
3.1	Konstruktion der <i>cph1</i> - und der <i>cph2-knockout</i> -Mutante .....	53
3.2	Analyse der lichtabhängigen <i>cph1</i> - und <i>cph2</i> -Transkription .....	54
3.3	Untersuchung des Wachstumsverhaltens .....	57
3.3.1	Einfluss verschiedener Lichtbedingungen auf das Wachstum des WT und der Phytochrommutanten .....	57

3.3.2	Kompetitives Wachstum von WT und Phytochrommutanten.....	59
3.3.3	Bestimmung von Photosyntheseparametern .....	62
3.3.3.1	Pigmentanalyse.....	62
3.3.3.2	Messung der maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsraten.....	63
3.3.3.3	77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren .....	65
3.4	Untersuchung der lichtinduzierten Motilität .....	67
3.4.1	Motilität unter verschiedenen Lichtbedingungen.....	67
3.4.1.1	Der Einfluss der Spektralfarbe auf die Motilität .....	67
3.4.1.2	Das phototaktische Verhalten unter bidirektionaler Einstrahlung von Licht .....	69
3.4.1.3	Aktionsspektrum der Motilität im blauen Wellenlängenbereich .....	70
3.4.1.4	Komplementationsanalyse: Austausch der chromophorbindenden Cysteine von Cph2 durch ortsgerichtete Mutagenese .....	73
3.4.1.5	Motilität von WT und <i>cph2</i> <sup>-</sup> in einer Mischkultur .....	75
3.4.1.6	Einfluss der externen Zugabe von cAMP und cGMP sowie der Photosyntheseinhibitoren DCMU und DBMIB auf die BL-gesteuerte Motilität.....	76
3.4.2	Untersuchungen der TypIV-Pili .....	78
3.4.2.1	Northern-Blot-Analyse.....	78
3.4.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	79
3.4.3	Untersuchung der Motilität weiterer Photorezeptormutanten.....	80
3.5	Analyse der IS-Elemente im <i>Synechocystis</i> –Chromosom.....	85
3.5.1	Vergleich des phototaktischen Verhaltens verschiedener WT-Varianten von <i>Synechocystis</i> .....	86
3.5.2	Untersuchung der BL-induzierten Motilität ausgewählter Photorezeptormutanten verschiedener WT-Varianten von <i>Synechocystis</i> .....	87
3.5.3	Analyse der IS-Elemente über Restriktionsfragment- Längenpolymorphismus (RFLP).....	89
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>97</b>
4.1	Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der Phytochrommutanten.....	98
4.2	Untersuchung von Photosyntheseparametern .....	101
4.3	Die Lichtregulation der <i>cph1</i> - und <i>cph2</i> -Transkriptakkumulation.....	107

4.4	Die Funktion der Phytochrome Cph1 und Cph2 in der lichtinduzierten Motilität .....	112
4.4.1	Aktionsspektrum und BL-Rezeptoren.....	114
4.4.2	GAF-Domänen-Analyse.....	118
4.4.3	Zwei Photorezeptoren vermitteln die positive Phototaxis in <i>Synechocystis</i> .....	119
4.4.4	Untersuchung der TypIV-Pili.....	122
4.4.5	Einfluss von cAMP und cGMP auf die Phototaxis .....	124
4.4.6	Weitere Photorezeptoren .....	126
4.5	Vergleich verschiedener WT-Varianten und Analyse der IS-Elemente .....	127
4.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	131
<b>5</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>136</b>
	Publikationsliste .....	X
	Danksagung .....	XI
	Erklärung .....	XII
	Lebenslauf .....	XIII

## Abkürzungsverzeichnis

<b>β-Car</b>	β-Karotin
<b>μ</b>	Wachstumsrate
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>BL</b>	Blaulicht
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>Car</b>	Karotinoide
<b>c-diGMP</b>	zyklisches Diguanosinmonophosphat
<b>Chl</b>	Chlorophyll
<b>Cm</b>	Chloramphenicol
<b>Cph</b>	cyanobakterielles Phytochrom
<b>Cry</b>	Cryptochrom
<b>d</b>	Tag
<b>DBMIB</b>	2,5-Dibromo-3-Methyl-6-Isopropyl-p-Benzchinon
<b>DCMU</b>	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-Dimethylharnstoff
<b>DMF</b>	N,N-Dimethylformamid
<b>Ech</b>	Echinenon
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FRL</b>	dunkelrotes Licht ( <i>far-red light</i> )
<b>g</b>	Gramm
<b>GL</b>	Grünlicht
<b>h</b>	Stunde
<b>HK-Domäne</b>	Histidinkinase-Domäne



<b>HL</b>	Starklicht ( <i>high light</i> )
<b>Km</b>	Kanamycin
<b>l</b>	Liter
<b>LL</b>	Schwachlicht ( <i>low light</i> )
<b>LM</b>	Laufmittel
<b>min</b>	Minute
<b>ML</b>	Normallicht ( <i>medium light</i> )
<b>MOPS</b>	3-Morpholino-Propansulfonsäure
<b>Myx</b>	Myxoxanthophyll
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>ORF</b>	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
<b>P<sub>fr</sub></b>	dunkelrotlichtabsorbierende Form von Phytochrom
<b>P<sub>r</sub></b>	rotlichtabsorbierende Form von Phytochrom
<b>PΦB</b>	Phytochromobilin
<b>PC</b>	Phycocyanin
<b>PCB</b>	Phycocyanobilin
<b>PCC</b>	Pasteur Culture Collection
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
<b>PSI</b>	Photosystem I
<b>PSII</b>	Photosystem II
<b>RFLP</b>	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
<b>RL</b>	RL
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
<b>SDS</b>	Sodiumdodecylsulfat

<b><i>Synechocystis</i></b>	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803
<b>t<sub>D</sub></b>	Verdopplungszeit
<b>v/v</b>	<i>volume per volume</i>
<b>w/v</b>	<i>weight per volume</i>
<b>WL</b>	Weißlicht
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>Zea</b>	Zeaxanthin

## Zusammenfassung

Phytochrome sind rotlicht(RL)- und dunkelrotlicht(FRL)-absorbierende Photorezeptoren, die eine Reihe von photomorphogenetischen Prozessen in höheren Pflanzen steuern. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der beiden cyanobakteriellen Phytochrome Cph1 und Cph2 untersucht. Dafür wurde zunächst das Wachstum von Mutanten mit einem inaktivierten *cph1*- bzw. *cph2*-Gen unter verschiedenen Lichtbedingungen analysiert. Das Wachstum aller Phytochrommutanten war unter Starklicht beeinträchtigt. Dahingegen wuchs die *cph1*-Mutante im FRL schlechter als der Wildtyp (WT), während das Wachstum der *cph2*-Mutante im RL vermindert war. Eine *cph1/cph2*-Doppelmutante zeigte unter allen Lichtbedingungen eine Wachstumsreduktion, die der jeweiligen Einzelmutante ähnlich war. Die genaue Ursache für die Beeinträchtigung des Wachstums der Phytochrommutanten konnte nicht ermittelt werden. Die verschiedenen Aspekte der Photosynthese, wie Pigmentzusammensetzung, maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates und 77K-Fluoreszenzemission, waren in den Phytochrommutanten nicht signifikant verändert.

Bei *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*) konnte eine lichtgerichtete Bewegung beobachtet werden, wobei man aufgrund von Aktionsspektren der Motilität eine Funktion der Phytochrome oder phytochromähnlichen Proteine bei der Steuerung der phototaktischen Bewegung vermutet. Dem Cph1-Protein konnte hierfür keine Rolle zugeordnet werden. Dahingegen scheint der Photorezeptor Cph2 die lichtgerichtete Bewegung der Zellen in Richtung einer Blaulichtquelle zu inhibieren. Das Aktionsspektrum der Motilität im Blaulicht (BL) ist mit dem Absorptionsspektrum der C-terminalen Chromophorbindungsdomäne von Cph2 vergleichbar, die keine Photokonversion aufweist, aber eine gegenüber dem roten Wellenlängenbereich erhöhte Absorption im BL zeigt. Auch konnte eine Interaktion mit einem klassischen BL-Rezeptor, wie für höhere Pflanzen bekannt, ausgeschlossen werden. Mutanten der potentiellen Vertreter von BL-Rezeptoren in *Synechocystis* (Cryptochrom, LOV-Phosphodiesterase und ein BLUF-Protein) wiesen im BL keinen gegenüber dem WT veränderten Phänotyp auf, d.h. diese Mutanten waren wie der WT nicht motil.

Die Untersuchung des Laufverhaltens verschiedener WT-Varianten von *Synechocystis* im BL ergab, dass die Unbeweglichkeit in diesem Licht auf den in dieser Arbeit verwendeten WT beschränkt war. Die vergleichende Analyse der IS-Elemente im Genom unserer WT-Variante zeigte gegenüber den im BL motilen Stämmen ein verändertes Muster. Ob dies die Ursache für den nichtmotilen Phänotyp war, konnte bisher nicht geklärt werden. Eine

Mutation in einem der Gene, die für einen BL-Rezeptor kodieren, konnte ausgeschlossen werden.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Photorezeptoren in Pflanzen

Die Fähigkeit, sich an Lichtbedingungen anzupassen, fördert maßgeblich die Überlebensfähigkeit von einfachsten bis zu komplexen Organismen. Dies beinhaltet die Akklimatisierung an hohe Lichtintensitäten, die über die Bildung von Sauerstoff- und anderen freien Radikalen in den Zellen unkontrollierte chemische Reaktionen mit biologisch wichtigen Makromolekülen herbeiführen und so ernsthafte Zellschädigungen hervorrufen können. Andererseits konkurrieren photosynthetisch aktive Organismen um ausreichendes Licht. Die Wahrnehmung von Lichtreizen geschieht über spezielle Photorezeptoren. Diese wurden hinsichtlich der Art des gebundenen Chromophors sowie der primären photochemischen Reaktion in verschiedene Klassen eingeteilt (van der Horst und Hellingwerf, 2004). Hierzu gehören die BL-Rezeptoren Cryptochrom (Cry), Phototropin (Phot), BLUF-Proteine und Xanthopsin, die Klasse der grünlicht(GL)- absorbierenden Rhodopsine sowie die reversibel RL/FRL-absorbierenden Phytochrome (Phy). Seit einigen Dekaden wird die Existenz von UV(B)-Photorezeptoren diskutiert, jedoch konnten diese bisher nicht näher charakterisiert werden (Frohnmeier und Staiger, 2003).

## 1.2 Die pflanzlichen Phytochrome

Die Beobachtung, dass RL und FRL morphogenetische Prozesse in Pflanzen steuern, führte zur Entdeckung der Phytochrome. Borthwick *et al.* beschrieben 1952, dass die Samenkeimung von lichtkeimenden Nutzpflanzen nach Bestrahlung mit Licht mit einem Wirkungsmaximum bei 650 nm induziert wurde. Nach einer erneuten Bestrahlung mit Licht bei einer Wellenlänge von ca. 730 nm wurde jedoch dieser Induktionseffekt inhibiert. Im Jahr 1959 wurde die erfolgreiche Isolierung eines photoreversiblen Pigments aus Pflanzen beschrieben, welches in zwei Formen auftretend sowohl RL als auch FRL absorbiert (Butler *et al.*, 1959). Frühen Hypothesen entsprechend wurde die aktive Konformation der FRL-absorbierenden Form des Phytochroms ( $P_{fr}$ ) zugeordnet und die inaktive der RL-absorbierenden Form des Phytochroms ( $P_r$ ), wobei als Chromophor ein Bilin zunächst vermutet und später bestätigt wurde (Hendricks und Borthwick, 1967; Furuya, 1993). Später zeigte sich, dass dieses Lichtreaktionssystem weitere photomorphogenetische Prozesse in

der Pflanze steuert, wie Blüteninduktion, Hypokotylwachstum und Schattenvermeidung. Außerdem spielen Phytochrome beim Neusetzen der zirkadianen Uhr eine Rolle.

In dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) wurden Gene für fünf verschiedene Phytochrome mit der Bezeichnung *phyA* bis *phyE* gefunden (Sharrock und Quail, 1989; Clack *et al.*, 1994). Die Existenz von Phytochromfamilien konnte auch für weitere Arten belegt werden, wie für die Tomate mit 5 (Hauser *et al.*, 1995) und den Reis mit 3 Mitgliedern (Mathews und Sharrock, 1996). Noch bevor die Existenz von verschiedenen phytochromkodierenden Genen in *A. thaliana* nachgewiesen werden konnte, wurden die pflanzlichen Phytochrome bereits in zwei Klassen unterteilt: die Vertreter vom Typ I sind lichtlabil, während zum Typ II lichtstabile Phytochrome gezählt werden (Furuya, 1993). In *A. thaliana* gehört nur PhyA der Gruppe vom Typ I an. PhyB-E hingegen werden dem Typ II zugeordnet (Wang und Deng, 2002). Phytochrome werden auch nach der Art ihrer Reaktion auf das eingestrahlte Licht charakterisiert: VLFR (*very low fluence response*) bezeichnet Prozesse, die bereits durch eine geringe Menge an  $P_{fr}$  ausgelöst werden und nicht mehr revertierbar sind. LFR (*low fluence response*) entspricht dem klassischen RL-/FRL-reversiblen Prozess. Reaktionen vom HIR-Typ (*high irradiance response*) erfordern eine längere Bestrahlung mit RL bzw. FRL oder Lichtpulse mit einer hohen Frequenz (Nagy und Schäfer, 2002; Fankhauser und Staiger, 2002). Im Fall von *A. thaliana* vermitteln die Phytochrome B, C, D und E Reaktionen vom LFR-Typ, während sich VLFR und HIR-Reaktionen auf PhyA beschränken (Nagy und Schäfer, 2002).

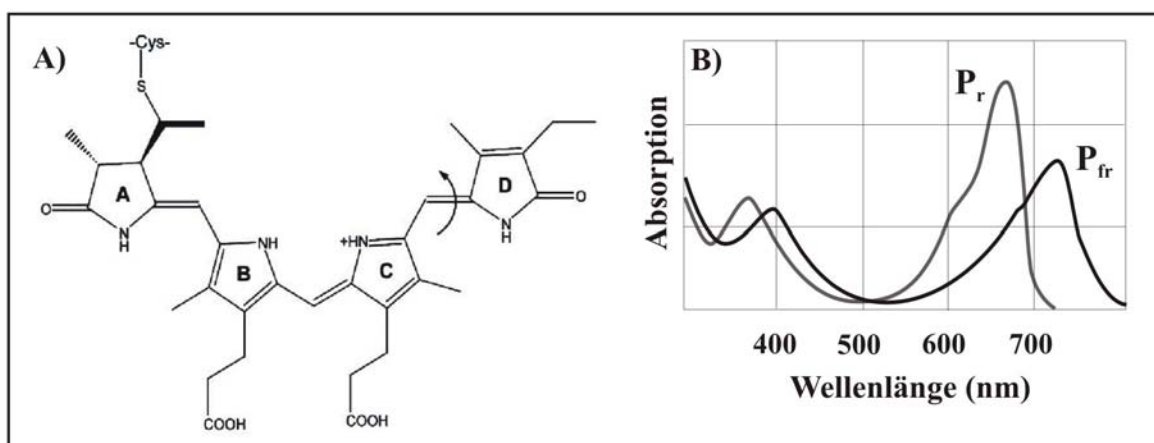
### 1.2.1 Molekulare Eigenschaften des Phytochroms

Phytochrome perzipieren das ankommende Licht über einen Chromophor. Im Fall von PhyA aus *A. thaliana* konnte als chromophore Gruppe das Phytochromobilin (PΦB) identifiziert werden (Wang und Deng, 2002). Es wird allgemein angenommen, dass auch die anderen pflanzlichen Phytochrome PΦB als Chromophor verwenden (Fankhauser, 2001). Dieses lineare Tetrapyrrol ist kovalent an ein Cystein in der chromophorbindenden Domäne des Apoprotein gebunden (Lagarias und Lagarias, 1989). Wie bereits erwähnt, wechseln Phytochrome zwischen zwei Konformationen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften: Die  $P_r$ -Form besitzt ein Absorptionsmaximum bei ca. 660 nm, die  $P_{fr}$ -Form hingegen bei 730 nm (Abb. 1B). Die Verschiebung des Absorptionsmaximums wird durch eine *trans-cis*-Isomerisierung der Doppelbindung zwischen dem C15 und dem C16-Atom

am D-Ring des PΦB (Abb. 1A) verursacht (Wang und Deng, 2002), wobei die *trans*-Form der P<sub>r</sub>-Konformation entspricht und die *cis*-Form der P<sub>fr</sub>-Konformation. Neben dem Absorptionsmaximum im roten bzw. dunkelroten Wellenlängenbereich weist das Phytochrom ein zweites Maximum im blauen Spektralbereich auf. Auch hier unterscheidet sich die P<sub>fr</sub>-Form von der P<sub>r</sub>-Form: Die erste bildet den Peak bei ca. 400 nm und die zweite bei ca. 370 nm (siehe Abb. 1B).

Pflanzliche Phytochrome werden in der biologisch inaktiven P<sub>r</sub>-Form synthetisiert. Durch die Absorption von rotem Licht erfolgt die Isomerisation zu der biologisch aktiven P<sub>fr</sub>-Form. Die Einstrahlung von FRL kehrt diesen Prozess um. Beide Vorgänge erfolgen über eine Reihe von Zwischenprodukten (Foerstendorf *et al.*, 1996). Ein vom Phytochrom-Typ abhängiger Prozentsatz an P<sub>fr</sub> wird im Dunkeln zur P<sub>r</sub>-Form revertiert. Jüngere Untersuchungen am lichtlabilen PhyA aus *A. thaliana* deuten daraufhin, dass die Dunkelreversion ein regulierter Prozess und keine Eigenschaft des Phytochrommoleküls ist (Nagy und Schäfer, 2002).

Da die Absorptionsspektren beider Konformationen sich teilweise überlappen, stellt sich ein wellenlängenabhängiges Photogleichgewicht zwischen der P<sub>r</sub>-Form und der P<sub>fr</sub>-Form ein. Im Sonnenlicht beträgt der Anteil der P<sub>fr</sub>-Form am gesamten Phytochrom ca. 60 %. Bei Beschattung durch eine dichte Vegetation liegt dieses Verhältnis bei ca. 10 %, da hier das FRL anteilig gegenüber dem RL zunimmt (Smith, 2000).



**Abb. 1: Photoisomerisation des Phytochromobilins (PΦB) von der *trans*-Form zur *cis*-Form (A) und Absorptionsspektren der P<sub>fr</sub>- und der P<sub>r</sub>-Form des pflanzlichen Phytochroms (B) (modifiziert nach Sengbusch, 1996).**

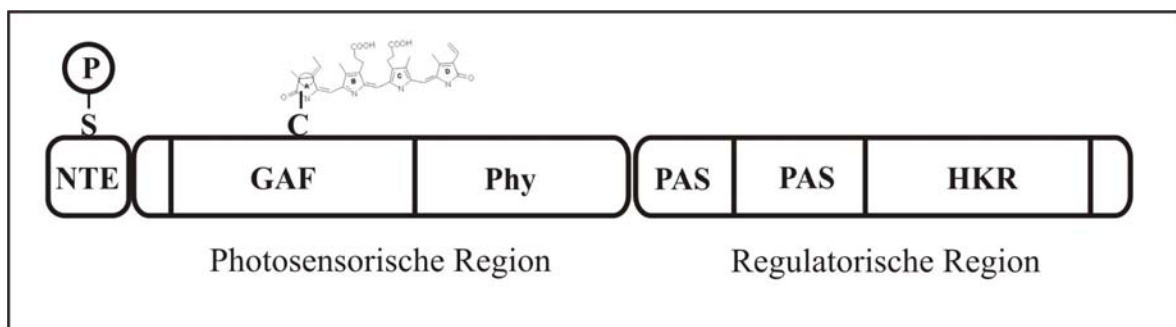
Pflanzliche Phytochrome sind lösliche Homodimere mit einem Molekulargewicht von ca. 125 kDa und einer Sequenz von meist 1100 Aminosäuren (AS). Die bisher bekannten Phytochrome in Pflanzen weisen eine sehr ähnliche Molekülarchitektur auf. Der N-terminale Teil besteht aus einer photosensorischen, den Chromophor bindenden *input*-Region mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa. Der C-terminale Teil umfasst die regulatorische *output*-Region und ist mit 55 kDa kleiner als die photosensorische Region (Abb. 2). Beide Teile setzen sich aus verschiedenen Domänen zusammen. Am N-Terminus befindet sich die gering konservierte NTE-Domäne (*N-terminal extension*). Es wird angenommen, dass diese Sequenz die funktionellen Unterschiede zwischen den pflanzlichen Phytochromen verursacht, wie z.B. die unterschiedliche Stabilität der P<sub>fr</sub>-Form in *A. thaliana* (Fankhauser, 2001). Für PhyA aus *Avena sativa* wurde demonstriert, dass der serinreiche erste Teil der NTE-Domäne in die Regulation zwischen den beiden Reaktionstypen VLFR und HIR, vermutlich über Phosphorylierung eines Serins, involviert ist (Casal *et al.*, 2002). Für die Chromophorbindung ist ein spezieller GAF-Domänen-Typ mit Bilinlyase-Aktivität verantwortlich. GAF-Domänen sind nicht nur auf photoaktive Proteine beschränkt, sondern wurden zuerst als konservierte Domäne bei cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen in Vertebraten, cyanobakteriellen Adenylatzyklasten und dem Transkriptionsfaktor FhlA aus *E. coli* beschrieben (Arvind und Ponting, 1997). Die chromophortragenden GAF-Domänen beinhalten eine kurze Insertion mit einem konservierten Cystein, mit dem das lineare Tetrapyrrol verknüpft ist (Galperin *et al.*, 2001).

Der regulatorische Teil besteht aus einer doppelten PAS-Domäne sowie einer Domäne mit Ähnlichkeit zu Histidinkinasen (HKR: *histidine kinase-related*). Die strukturell den GAF-Domänen ähnelnden PAS-Domänen wurden überwiegend in Proteinen gefunden, die direkt oder indirekt in Signaltransduktionen involviert sind. Wie diese kommen sie in Proteinen aus Organismen der drei Hauptreiche Eukaryota, Bacteria und Archaea vor. Dieser Domänentyp besitzt die Fähigkeit, Biline, Flavine und Nukleotid-Kofaktoren zu binden. Zu den Stimuli, die von PAS-Domänen wahrgenommen werden, gehören u.a. Licht, Sauerstoff und das Redoxpotential (Taylor und Zhulin, 1999). Weiterhin wird eine stabilisierende Funktion dieser Domänen bei der Bildung von Dimeren diskutiert. Im Fall der pflanzlichen Phytochrome sind die beiden PAS-Domänen für die Interaktion mit Signalkomponenten (Fankhauser, 2001) notwendig. Außerdem wird ihnen eine Rolle bei der Stabilisierung der P<sub>fr</sub>-Form von PhyB in *A. thaliana* (Fankhauser, 2001; Elich und Chory, 1997) zugeschrieben. Die am C-Terminus befindliche HKR-Domäne besitzt



Ähnlichkeit zu den bakteriellen Histidinkinasen von Zwei-Komponenten-Systemen. Eine licht- und chromophorregulierte Phosphorylierung eines rekombinant exprimierten PhyA aus *Avena sativa* konnte gezeigt werden (Yeh und Lagarias, 1998), wobei jedoch anstelle des Histidins ein Serin (S598) phosphoryliert wurde (Lapko *et al.*, 1999). Lapko *et al.* (1999) zeigten außerdem, dass die Phosphorylierung des S598 nur bei PhyA-Präparationen aus RL-bestrahlten Keimlingen von *Avena sativa* zu beobachten war und nicht bei im Dunkeln gewachsenen Keimlingen. Pflanzliche Phytochrome werden daher als Serin/Threonin-Proteinkinasen betrachtet.

Inwieweit die Kinaseaktivität für die Phytochromfunktion benötigt wird, ist weiterhin Gegenstand von Diskussionen (Wang und Deng, 2002; Nagy und Schäfer, 2002).



**Abb. 2: Schematische Domänenarchitektur pflanzlicher Phytochrome.** NTE: *N-terminal extension*; GAF: Domärentyp, der zuerst in cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen, cyanobakteriellen Adenylatzyklasen und im Transkriptionsaktivator FhlA gefunden wurde. An ein Cystein in der GAF-Domäne ist das PΦB gebunden. Phy: **Phytochrom**-Domäne; Diese entspricht einer GAF-ähnlichen Domäne, die durch die PFAM-Database als eine gesonderte Domäne erkannt wird. PAS (**P**ER-**A**RNT-**S**IM): Domäne, die ursprünglich in eukaryotischen Transkriptionsfaktoren gefunden wurden: in PER (*period clock protein*) aus *Drosophila melanogaster*, ARNT (*aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator*) aus Vertebraten und SIM (*single minded*) aus *Drosophila melanogaster*; HKR: *histidin kinase-related domain*; Modifiziert nach Montgomery und Lagarias (2002).

### 1.2.2 Intrazelluläre Lokalisation

Das PΦB wird in den Chloroplasten aus Häm über das Zwischenprodukt Biliverdin IX $\alpha$  gebildet. Der Chromophor wandert in das Cytosol und wird mit dem dort synthetisierten Phytochrom-Apoprotein verknüpft (Wang und Deng, 2002). Mittels GUS- und GFP-Fusionsproteinen konnte die lichtregulierte Translokation von PhyA und PhyB in den Zellkern von *A. thaliana* beschrieben werden. Der Import von PhyB in den Zellkern wird durch Bestrahlung mit Weiß- oder RL ausgelöst. Dahingegen wird die Translokation von

PhyA sowohl von RL als auch FRL induziert. Im Gegensatz zu PhyB ist der PhyA-Import strikt lichtinduziert und erfolgt mit einer wesentlich größeren Geschwindigkeit (Kircher *et al.*, 2002).

Im Zellkern sammeln sich die Phytochrome in definierten Bereichen und bilden eine als „Flecken“ bezeichnete Struktur. Im Fall von PhyB aus Tabak konnten Mas *et al.* (2000) nachweisen, dass diese „Flecken“ zusätzlich zu PhyB den BL-Rezeptor Cryptochrom 2 (Cry2) enthielten und beide Photorezeptoren interagieren. Aufgrund dieser Entdeckung wurde postuliert, dass zumindest die PhyB-enthaltenden „Flecken“ aktive Transkriptions- oder auch Degradationskomplexe mit einer wahrscheinlich hohen Anzahl von interagierenden Molekülen darstellen (Nagy und Schäfer, 2002).

Die Phytochrome C, D und E aus *A. thaliana* weisen ebenfalls einen lichtinduzierten Transport und „Flecken“-Bildung auf (Kircher *et al.*, 2002). Das Auftreten der Akkumulationsstrukturen von PhyA bis PhyE in *A. thaliana* wird unterschiedlich durch das Licht reguliert und unterliegt einem diurnalen Rhythmus (Kircher *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Signaltransduktionswege

Trotz der langjährigen Forschung am pflanzlichen Phytochrom existieren große Lücken im Wissen um die Weiterleitung des Signals nach der Aufnahme des Lichtreizes. Auf Phytochrom zurückführbare Reaktionen unterscheiden sich stark in ihrer Geschwindigkeit. Diese Beobachtung sowie die Ähnlichkeit der C-terminalen Region zu bakteriellen Zwei-Komponenten-Systemen lassen vermuten, dass die Signalübertragung auf verschiedenen Wegen erfolgt.

In den letzten Jahren konnten einige Arbeitsgruppen mittels *two-hybrid*-Systemen in Hefen und *pull-down*-Experimenten eine Reihe von potentiellen Interaktionspartnern von pflanzlichen Phytochromen aufspüren. Zu den zuerst gefundenen gehören neben den BL-Rezeptoren Cry1 und Cry2 (Ahmad *et al.*, 1998; Mas *et al.*, 2000) die Proteine *phytochrome interacting factor 3* (PIF3) (Ni *et al.*, 1998) und PIF4 (Huq und Quail, 2002), das *phytochrome kinase substrat 1* (PKS1) (Fankhauser *et al.*, 1999), die *nucleoside diphosphate kinase 2* (NDPK2) (Choi *et al.*, 1999), der *A. thaliana response regulator 4* (ARR4) (Sweere *et al.*, 2001), das Protein *early flowering 3* (ELF3) (Liu *et al.*, 2001) sowie das Phytohormon Auxin (Colón-Carmona *et al.*, 2000). Der Großteil dieser Interaktionspartner ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert. ARR4 und NDPK2 wurden

sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma nachgewiesen. Nur PKS1 scheint auf das Cytoplasma begrenzt zu sein.

PKS1 wird durch PhyA in lichtabhängiger Weise phosphoryliert. Die exakte Funktion dieses cytoplasmatischen Proteins ist nicht bekannt. Jedoch nimmt man aufgrund der Analysedaten von PKS1-Überexpressionsmutanten an, dass PKS1 als negativer Regulator von PhyB fungiert bzw. die von PhyA und B ausgehenden Signaltransduktionswege miteinander koordiniert (Fankhauser *et al.*, 1999). PIF3 wurde vergleichsweise intensiv untersucht. Dieses Protein gehört zur Klasse der *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktoren und bindet sequenzspezifisch an die G-Box, einem Motiv in der Promotorregion verschiedener lichtregulierter Gene. DNA-gebundenes PKS1 interagiert reversibel mit PhyB in seiner P<sub>fr</sub>-Form (Quail, 2002). ARR4 interagiert spezifisch mit den ersten 173 Aminosäuren der N-terminalen Region von PhyB aus *A. thaliana*. ARR4 besitzt wahrscheinlich eine signalintegrierende Funktion zwischen dem RL-perzipierenden PhyB und dem Phytohormon Cytokinin (Sweere *et al.*, 2001).

Der gegenwärtige Wissensstand in der Phytochromforschung lässt erkennen, dass die von pflanzlichen Phytochromen ausgehende Signaltransduktionswege ein komplexes Netzwerk bilden. Die frühen Komponenten der Signalkette lassen sich in drei Gruppen einteilen: (I) *downstream* von PhyA (z.B. SPA1, PAT1, FHY1), (II) von PhyB (z.B. ELF3, PIF4, GIGANTEA) oder (III) von beiden Phytochromen (z.B. PIF3, NPDK2, PSI2) agierende Proteine (Quail, 2002; Kim *et al.*, 2002). Die nach diesem Modell über diese Übertragungswege weitergeleiteten Signale münden teilweise in einen „Signal-Integrations“-Prozess, der mechanistisch bisher undefiniert ist. Dieser Integrationsprozess umfasst positive Faktoren - wie HY5 - oder negative Regulatoren der Photomorphogenese - wie die DET/COP/FUS-Gruppe (Quail, 2002; Kim *et al.*, 2002). Komponenten aus der DET/COP/FUS-Gruppe bilden im Kern einen Multiprotein-Komplex, das COP9-Signalosom. Aufgrund der Ähnlichkeit dieses Komplexes mit dem 26S-Proteasom aus Eukaryoten wird angenommen, dass das COP9-Signalosom für eine gezielte Degradation von Proteinen im Kern verantwortlich ist (Quail, 2002; Schäfer und Bowler, 2002).

Neben diesen Beispielen für Phytochrom-Interaktionspartner wird seit vielen Jahren die Rolle von cGMP, Ca<sup>2+</sup>-Ionen und Calmodulin als *second messenger* bei der Vermittlung von cytoplasmalokalisierten Signaltransduktionswegen diskutiert. Neuere Untersuchungsergebnisse im Fall von G-Proteinen und Ca<sup>2+</sup>-Ionen lieferten Hinweise für eine mögliche

Funktion bei der phytochromregulierten Genexpression (Schäfer und Bowler, 2002).

Zu den am schnellsten eintretenden Wirkungen von Phytochromen gehören verschiedene elektrische Reaktionen. Es liegen Berichte vor über die Involvierung von Phytochromen im Ionen-Flux über die Plasmamembran bei *Physcomitrella* und einer Reihe von Grünalgen sowie die Chloroplastenbewegung bei der Grünalge *Mougeotia* (Neff *et al.*, 2000).

Phytochromen wird Proteinkinase-Aktivität zugeschrieben, die jedoch nur im Fall von PhyA aus *A. sativa* nachgewiesen werden konnte (siehe Kap.1.2.1). In der Literatur werden verschiedene Prozesse aufgeführt, in die eine Proteinkinase-Aktivität involviert sein könnte. Beispiele hierfür sind die Regulation der nukleo-cytoplasmatischen Verteilung der Phytochrome oder auch die Lokalisierung weiterer Komponenten von die Genexpression steuernden Signalketten (Nagy und Schäfer, 2002). Weiterhin könnten Phytochrome auf diese Weise die Aktivität von anderen Kinasen oder Enzymen beeinflussen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kinasen oder cGMP-synthetisierende Enzyme. Über die Phosphorylierung spezieller Proteine könnten Phytochrome das Öffnen und Schließen von Ionenkanälen steuern (Kim *et al.*, 2002). Diese Photorezeptoren könnten jedoch auch Teil eines neuartigen *two-component-phosphorelay*-Systems darstellen, wie es für PhyB und seinen Response-Regulator ARR4 postuliert wurde (Sweere *et al.*, 2001; Wang und Deng, 2002).

Trotz der zunehmenden Erkenntnisse zur PhyA- und PhyB-abhängigen Signaltransduktion ist wenig über Signalketten bekannt, die von PhyC-E ausgehen. Die Fähigkeit dieser Phytochrome zur Translokation ist bekannt (siehe Kap.1.2.2), jedoch konnte bisher kein Interaktionspartner gefunden werden (Nagy und Schäfer, 2002).

## 1.3 Die Entdeckung von phytochromähnlichen Proteinen in *Synechocystis*

Lange Zeit nahm man an, dass Phytochrome auf das Pflanzenreich beschränkt sind. Dies änderte sich, als Mitte der 90er Jahre die phytochromähnlichen Proteine RcaE im Cyanobakterium *Fremyella diplosiphon* (Kehoe und Grossman, 1996) und PlpA in *Synechocystis* (Wilde *et al.*, 1997) gefunden wurde sowie die erste vollständige Sequenz des Cyanobakteriums *Synechocystis* veröffentlicht wurde. Die Analyse des Genoms ergab, dass

das *Synechocystis*-Genom mehrere offene Leserahmen (ORF) mit Ähnlichkeit zu pflanzlichen Phytochromen enthält (Kaneko *et al.*, 1996). Schmitz *et al.* (2000) beschrieben ein weiteres phytochromähnliches Protein, das CikA in *Synechococcus elongatus* (PCC7942). Spätestens mit der Entdeckung phytochromähnlicher Proteine in den nichtphotosynthetischen Eubakterien *Deinococcus radiodurans* und *Pseudomonas aeruginosa* (Davis *et al.*, 1999) stellte sich heraus, dass Phytochrome eine weitaus vielfältigere Klasse von Photorezeptoren sowie phylogenetisch viel älter sind als bis zu diesem Zeitpunkt angenommen.

### 1.3.1 Das cyanobakterielle Phytochrom 1 (Cph1)

Das vom ORF slr0473 (Cyanobase) kodierte Protein Cph1 weist unter den der Phytochromgruppe zugehörigen Proteinen in *Synechocystis* die größte Ähnlichkeit zu pflanzlichen Phytochromen auf (Abb. 3 und Abb. 4). Die C-terminale Region des Cph1-Proteins gleicht den Sensor-Histidinkinasen eubakterieller Zwei-Komponenten-Systeme. Die Domänenarchitektur von Cph1 unterscheidet sich in einigen Punkten von der pflanzlicher Phytochrome. Der cyanobakterielle Photorezeptor ist mit 748 AS wesentlich kürzer als die bekannten Phytochrome aus Pflanzen. Am N-Terminus fehlt die NTE-Domäne. Stattdessen besitzt Cph1 in diesem Bereich eine zusätzliche PAS-Domäne (Abb. 4). Weiterhin fehlt die Doppel-PAS-Domäne im regulatorischen Modul des Cph1-Proteins.

Phytochrome zeichnen sich durch die Eigenschaft zur Photokonversion zwischen einer RL- und einer FRL-absorbierenden Konformation aus. Mittels eines rekombinanten Cph1-Apoproteins aus *E. coli* konnte die Fähigkeit zur autokatalytischen Bindung des linearen Tetrapyrrols Phycocyanobilin (PCB) nachgewiesen werden. Das resultierende Cph1-Holo-protein zeigt die für Phytochrome charakteristische *cis-trans*-Isomerisierung nach Anregung mit RL bzw. FRL. Somit kann das cyanobakterielle Cph1 als echtes Phytochrom bezeichnet werden (Hughes *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). Das Vorkommen von PΦB in *Synechocystis* konnte bisher nicht gezeigt werden. Der ORF slr0116 mit der größten Ähnlichkeit seines Genprodukts zur PΦB:Ferredoxin-Oxidoreduktase (HY2), welche in *A. thaliana* das Bili-verdin IXα zu PΦB umwandelt (Kohchi *et al.*, 2001), kodiert in *Synechocystis* für eine PCB:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PcyA; Frankenberg *et al.*, 2001). Trotzdem konnte die Fähigkeit von Cph1 zur autokatalytischen Bindung von PΦB mit einem gegenüber dem Cph1-PCB-Holoprotein leicht verschobenen Absorptionsmaximum nachgewiesen werden.

Unabhängig vom gebundenen Chromophor, wies die  $P_{fr}$ -Form von Cph1 in beiden Fällen (706 nm beim PCB-Cph1- bzw. 718 nm beim PΦB-Cph1-Addukt) gegenüber der entsprechenden Form des pflanzlichen Phytochroms eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den kürzerwelligen Bereich auf. Dieses Resultat lässt sich mit der fehlenden NTE-Domäne erklären (Yeh *et al.*, 1997). Hingegen ähnelte das Absorptionsmaximum der  $P_r$ -Form (654 nm beim PCB-Cph1- bzw. 668nm beim PΦB-Cph1-Addukt) dem des pflanzlichen Phytochroms. Die Ähnlichkeit zwischen dem Differenzspektrum des rekombinant exprimierten Cph1-Proteins mit PCB als Chromophor aus *E. coli* und dem Differenzspektrum des aus *Synechocystis* isolierten Cph1-Proteins weist auf PCB als natürlichen Chromophor hin (Hübschmann *et al.*, 2001a). Weiterhin konnte mittels *fluorescence-resonance-energy-transfer*-Technik belegt werden, dass sich Cph1 wie pflanzliche Phytochrome zu Dimeren zusammen lagert (Otto *et al.*, 2003).

Wenige Basenpaare hinter dem *cph1*-Gen wurde ein ORF (slr0474) entdeckt, der für den Response-Regulator Rcp1 kodiert (Lamparter *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997). Dieses 147 AS lange Protein gehört zur Superfamilie der Response-Regulatoren vom CheY-Typ. Yeh *et al.* (1997) konnten den Transfer eines Phosphat-Restes von Cph1 auf Rcp1 demonstrieren: Die Autophosphorylierung des Histidins H538 in der HK-Domäne im Cph1-Protein findet hauptsächlich in seiner  $P_r$ -Form nach der Perzeption von FRL statt. Das Phosphat wird von Cph1 auf das Aspartat D68 in Rcp1 übertragen. Interessanterweise deuten die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe darauf hin, dass im Gegensatz zum pflanzlichen Phytochrom die  $P_r$ -Form die aktive Konformation ist. Allerdings sehen Hughes und Lamparter (1999) die Möglichkeit, dass Cph1 einen bifunktionalen Photorezeptor mit einer Proteinkinase-Form ( $P_r$ ) und einer Proteinphosphatase-Form ( $P_{fr}$ ) darstellt. Das daraus abgeleitete Vorhandensein von mehr als einer aktiven Form konnte jedoch noch nicht experimentell belegt werden. Der Response-Regulator Rcp1 ist das einzig bekannte Nachfolgeglied in der von Cph1 induzierten Signaltransduktionskette. Dieses Protein besitzt keine DNA-bindende Domäne. Daher ist zu vermuten, dass die Signalweiterleitung über einen komplexeren Weg als das einfache Zwei-Komponenten-System erfolgt.

Obwohl Cph1 photochemisch und photophysikalisch intensiv untersucht wurde, konnte noch keine biologische Funktion dieses Photorezeptors nachgewiesen werden. Allerdings wurden Daten zur Regulation der Expression des *cph1/rcp1*-Operons veröffentlicht, die auf einen Einfluss von Licht, Glukose und Eisenmangel auf die Menge an *cph1/rcp1*-mRNA verweisen (García-Domínguez *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2003).

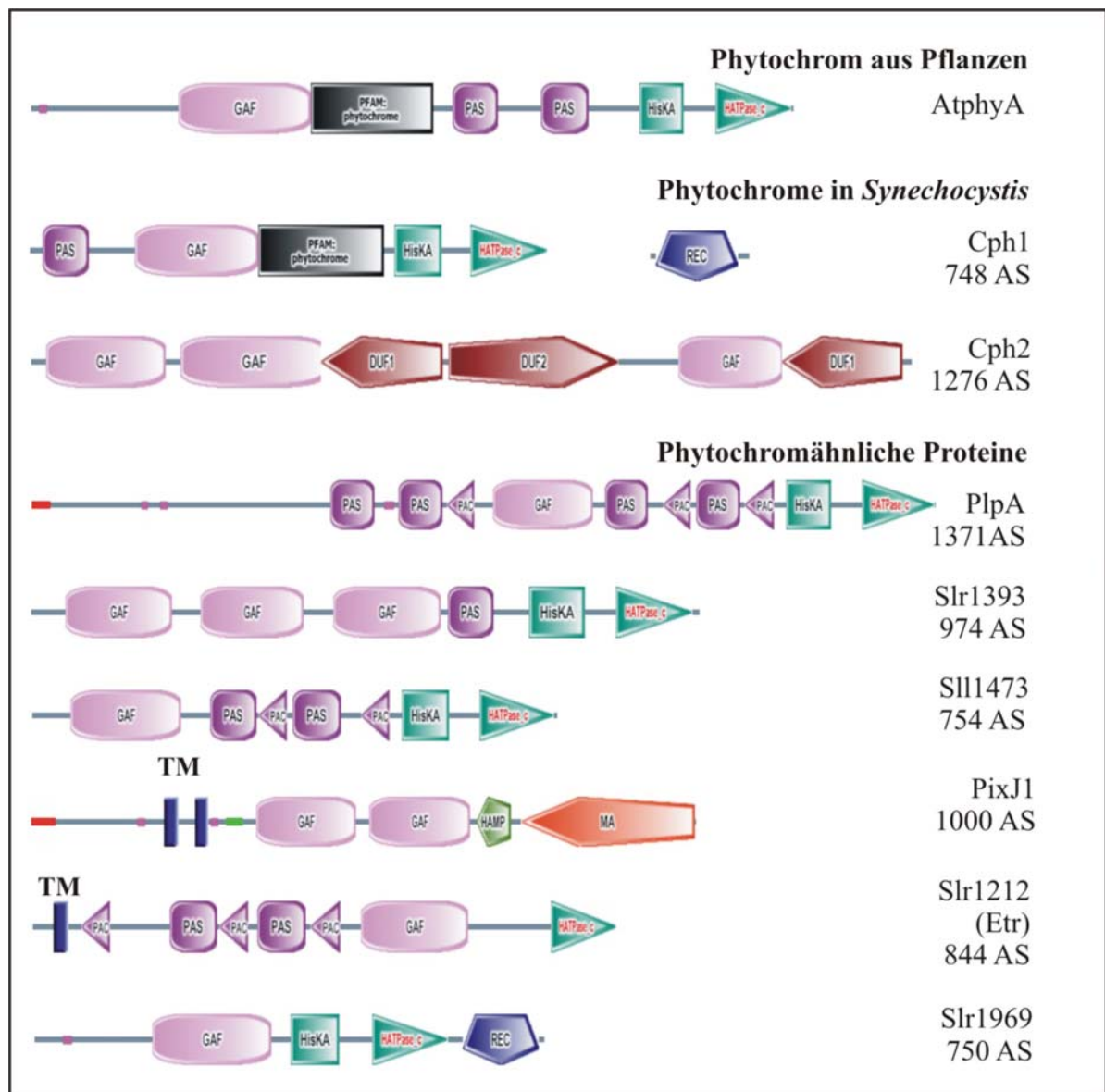
### 1.3.2 Das cyanobakterielle Phytochrom 2 (Cph2)

11

Proteins sowie Cph2-Fragmenten, dass die beiden äußeren GAF-Domänen ein lineares Tetrapyrrol autokatalytisch binden können. Die Bindung von PΦB sowie PCB als Chromophor erfolgt am Cystein C129 der N-terminalen GAF1-Domäne und am C1022 der C-terminalen GAF3-Domäne. Die Bilinlyase-Aktivität der mittleren GAF-Domäne wurde bisher nicht nachgewiesen. Das konservierte Cystein ist in dieser Domäne nicht vorhanden (Abb. 5). Die beiden Chromophor-Bindungsdomänen weisen nicht die gleichen spektroskopischen Eigenschaften auf. Nur an die N-terminale GAF1-Domäne assembliertes PΦB oder PCB ist zur RL-FRL-Photokonversion befähigt, wobei sowohl die Absorptionsmaxima der P<sub>fr</sub>- als auch der P<sub>r</sub>-Form gegenüber den entsprechenden Konformationen von Cph1 in den kürzerwelligen Bereich verschoben sind (Park *et al.*, 2000; Wu und Lagarias, 2000). Die GAF3-Domäne mit PCB als Addukt ist nicht photochromisch. Das im blauen Wellenlängenbereich liegende Absorptionsmaximum ist gegenüber dem im roten Bereich erhöht (Wu und Lagarias, 2000). Die gleichen Autoren vermuten, dass eine Region von 20 bis 23 AS in der Nähe des chromophorbindenden Cysteins für die Fähigkeit zur Photokonversion entscheidend ist. Diese Region fehlt in der AS-Sequenz der GAF3-Domäne. Welcher Chromophor *in vivo* an Cph2 bindet, ist nicht bekannt.

Der Cph2-Photorezeptor enthält die für Phytochrome ungewöhnlichen Domänen GGDEF und EAL (Abb. 4). Diese beiden Domänentypen sind mit Ausnahme obligater Parasiten unter den Eubakterien weit verbreitet. Oftmals sind sie Teil großer Multi-Domänen-Proteine, die experimentell kaum bzw. gar nicht charakterisiert sind. Interessanterweise wurden beide Domänentypen sowohl in sensorischen als auch regulatorischen Modulen prokaryotischer Signaltransduktionssysteme gefunden (Galperin *et al.*, 2001). Die GGDEF-Domäne wurde zuerst als konserviertes Sequenzmotiv in der C-terminalen Region des Response-Regulators PleD in *Caulobacter crescentus* beschrieben. PleD ist in der Steuerung der Differenzierung von beweglichen Schwärmer- zu unbeweglichen Stielzellen involviert, in dem das Protein wahrscheinlich eine Immobilisierung der Schwärmerzelle durch Abschalten der Flagellum-Rotation und Bildung des charakteristischen Stieles auslöst (Hecht und Newton, 1995). In *Acetobacter xylinum* regulieren GGDEF-EAL-Domänen-Proteine die extrazelluläre Zellulose-Biosynthese. In diesem Zusammenhang wurde ein neuartiges Effektormolekül identifiziert, das zyklische Diguanosinmonophosphat (c-diGMP) (Galperin *et al.*, 2001). Gegenwärtig wird die Funktion dieser Domänenkombination als c-diGMP-Zyklase bzw. -Phosphodiesterase diskutiert.





**Abb. 4: Domänenarchitektur der Phytochrome und phytochromähnlichen Proteine in *Synechocystis*.** Die Organisation der Domänen wurde mit dem Domänenanalyse-Programm Smart (<http://smart.embl-heidelberg.de>) bestimmt. GAF: Domärentyp, der zuerst in cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen, cyanobakteriellen Adenylatzyklen und im Transkriptionsaktivator FhlA gefunden wurde. PFAM-phytochrome: entspricht der PHY-Domäne aus Abb. 2; PAS: siehe Abb. 2; PAC: Motiv, welches sich C-terminal der PAS-Domäne anschließt; HisKA (Dimerisations- und Phosphoakzeptor-Domäne) und HATPase\_c sind Subdomänen der HK-Domäne; REC: CheY-homologe Receiver-Domäne; DUF1: entspricht der GGDEF-Domäne; DUF2: entspricht der EAL-Domäne; HAMP: Domäne in Histidinkinasen, Adenylcyclasen, Methyl binding proteins, Phosphatasen; MA: Methyl-accepting chemotaxis-like domains (chemotaxis sensory transducer); TM: Transmembran-Domäne.

Über die Art der Signalweiterleitung vom Cph2-Photorezeptor auf ein Akzeptormolekül liegen keinerlei Erkenntnisse vor. Wie bereits erwähnt, besitzt Cph2 keine HK-Domäne, so

dass die Signaltransduktion nicht über ein klassisches Zwei-Komponenten-System stattfinden kann. Eine Weiterleitung des Signals könnte über Protein-Protein-Interaktion erfolgen oder über eine mögliche Zyklisierung bzw. Aufspaltung von c-diGMP. Beide Prozesse wurden für Cph2 bisher nicht nachgewiesen.

### 1.3.3 Phytochromähnliche Proteine in *Synechocystis*

Das *Synechocystis*-Chromosom enthält weitere ORFs mit teilweise geringer Ähnlichkeit ihrer Genprodukte zu pflanzlichen Phytochromen (Abb. 4). Da ihre Fähigkeit zur Photokonversion nicht nachgewiesen wurde, werden diese Proteine zu der Gruppe der phytochromähnlichen Proteine zusammengefasst. Nur für wenige phytochromähnliche Proteine wurde Bilinlyase-Aktivität dokumentiert.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Klassifizierungsmöglichkeiten bakterieller Phytochrome vorgeschlagen. So teilen Montgomery und Lagarias (2002) diese Proteine hinsichtlich der Domänenarchitektur in die Familien (1) Cph1, (2) Cph2 und (3) phytochromähnliche Proteine ein, wonach die in diesem Kapitel beschriebenen Proteine zu einer eigenständigen Gruppe zusammengefasst werden. Vierstra und Davis (2000) betrachten nur den bekannten bzw. vermuteten Bindungsort des Chromophors innerhalb der GAF-Domäne. Demnach lassen sich die bakteriellen Phytochrome bzw. phytochromähnlichen Proteine in eine CH-, XH und eine CL-Gruppe einteilen. Im Fall der erstgenannten CH-Gruppe folgt dem chromophorbindenden Cystein ein Histidin, welches für die Anheftung des Chromophors und dessen Photochromozität eine wichtige Rolle spielt (Vierstra und Davis, 2000). Zu diesem Typ gehören alle bekannten Phytochrome aus Pflanzen sowie Cph1, Cph2 und einige Vertreter der phytochromähnlichen Proteine. Bei dem CL-Typ befindet sich an der Stelle des konservierten Histidins ein Leucin. Bei der XH-Gruppe fehlt das konservierte Cystein. Stattdessen ist diese Position durch eine hydrophobe Aminosäure wie Leucin, Valin oder Methionin besetzt. Ein Beispiel für diesen Typus stellt CphB aus *Calothrix* sp. PCC 7601 dar. Bei diesem Protein wird ein lineares Tetrapyrrol nichtkovalent an ein Leucin gebunden. Trotzdem konnte für CphB die Fähigkeit zur Photokonversion mit einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von  $P_{fr}$  und  $P_r$  in den längerwelligen Bereich nachgewiesen werden (Jorissen *et al.*, 2002). Bei dem Photorezeptor Agp1 aus *Agrobacterium tumefaciens* befindet sich auf der Cysteinposition ein Valin. Doch als Bindungsort des Chromophors erwies sich das Cystein C20 außerhalb der GAF-

Domäne (Lamparter *et al.*, 2002).

Für *Synechocystis* wurde eine Zahl von 10 phytochromähnlichen Proteinen angenommen (Montgomery und Lagarias, 2002). Über die Mitglieder dieser Gruppe wurde, mit Ausnahme von PlpA und PixJ1, wenig publiziert. In Abb. 5 ist ein multiples Alignment der Aminosäuresequenz der GAF-Domänen aus den phytochromähnlichen Proteinen sowie den echten Phytochromen aus *Synechocystis* (Cph1 und Cph2) und höheren Pflanzen (*At-PhyA-E* und *As-PhyA*) dargestellt.

		*	20	*	40	*	60	*	80		
At-PhyA	:	LGLHYPATDI	PQAARFLFMKNKVR	IVDCN	--AKHARV	QIEKLSFDLT	LCGSTLRAPHS	CHLQYMANMDSIAS	EVMAVNVN	: 80	
As-PhyA	:	LGLHYPATDI	PQAARFLFMKNKVR	IVDCR	--ARSIKV	EAEALPFDI	SLCGSALRAPHS	CHLQYMANMNSIAS	EVMAVNVN	: 80	
At-PhyB	:	LGLHYPATDI	PQASRFLFKQNRVR	IVDCN	--ATPVLV	QIDRLTQSMCLV	GSTLRAPHC	CHSQYMANMGSIAS	EVMAVNTIN	: 80	
At-phyD	:	LGLHYPATDI	PQASRFLFKQNRVR	IVDCY	--ASPVRV	QIDRLTQFICLV	GSTLRAPHC	CHAQYMANMGSIAS	EVMAVNTIN	: 80	
At-phyE	:	LGLHYPATDI	PQAARFLFKQNRVR	IVDCN	--ATPVKV	QSEELKRPLCLVN	STLRAPHC	CHTQYMANMGSVAS	ALAVVVK	: 80	
At-PhyC	:	LGLHYSATDI	PQASRFLFMKNKVR	IVDCS	--AVPVKV	QIKSLSQPISL	SGSTLRAPHC	CHAQYMANMGSVAS	EVMAVNTIN	: 80	
Cph1	:	LGLHYPESDI	PQPARRLF	FIHNPIR	YIPDVYGVAVPLT	PAVNPSTNRAVDL	TESILRSAYH	CHLTLYLKNMGV	GASTIISLTKD	: 82	
Cph2-GAF1	:	LGLHFPVEDI	PPQAREELGNQRKM	IAVDVAHRRKKSHE	ISGRISPT	TEHSN	--GHYTTVDS	CHIQLYLAMGVL	SSITVEVMQD	: 80	
Cph2-GAF2	:	MAAVQSTWEK	RPFTSVAPLPPTNCV	PHG	-----YTIGLE	-----	QRSDWIAPPE	SLSAENPQS	FETIVPLAAD	: 64	
Cph2-GAF3	:	INDEIDDP	PCFKG--HYLR	LYREGVR	-----AVSIE	-----	KADLADCH	KELLRHYQVK	ANLVVPVFN	: 58	
PlpA	:	WOMDLSPE	SFP--ECYQ	RYLNGY	Y-----ASRQL	-----	PDCAINCAV	QCETVAESQ	SRIVAPVFD	: 58	
PixJ1-GAF1	:	QGLIDSKD	--BHP--WGQ	EDMPSQIV	-----AINETS	-----	GASISNPHRQ	WLEQHQV	KASTVPHRD	: 56	
PixJ1-GAF2	:	LGATIADPC	FAD--SYVEK	YRSGRIQ	-----ATRIY	-----	NAGLTPCH	IGQLKPF	EVKANLVAPIN	: 58	
Sll1473	:	LGRFSD	EVFV--EYH	QAYTKGVR	-----AINID	-----	QDDIETCL	ADFEVKQF	GVKSKLVVPLQH	: 58	
Slr1212	:	INSAIEET	CFSN--NYA	QRYQQGR	IQ-----VIEIH	-----	QSHLRQCH	IDELAR	LQVRANLVPLIND	: 58	
Slr1393-G1	:	DEPCAD	CRWLHLLG	QLPHYGLWT	WE-----GEGE	-----	FVQLDPVQ	GEEFCRTL	LGIKSLHLEPLVIN	: 59	
Slr1393-G2	:	LPPKERV	PLSS--RWID	HFAKGL	L-----AMD	TD-----	DQR-ADFD	QSMALAK	ANLVVPEFSG	: 55	
Slr1393-G3	:	KDLQNN	FPLWQD--TYL	QENEGGR	YRNHES	-----LAVG	VE-----	TAGFTD	CHLDNLR	RFEIRAFETVPEVVG	: 63
Slr1969	:	LGIMTEND	CFSQVFSY	EQKYLKGA	IV-----AVSIE	NIEN-----	HYSSSY	CLVGLL	QRYQVRANLVAPIVE	: 61	

**Abb. 5: Multiples Sequenz-Alignment zwischen der chromophorbindenden Region innerhalb der GAF-Domänen pflanzlicher Phytochrome und den GAF-Domänen von Phytochromen bzw. phytochromähnlichen Proteinen aus *Synechocystis*.** Ähnlichkeitsgruppierungen: (1) D = E, (2) K = R, (3) F = Y = W, (4) L = I = V = M; Konservierungsgrad: **G** = 100 %, **G** = 80 %, **G** = 60 %; *A. thaliana* (*At-PhyA-E*); *Avena sativa* (*As-PhyA*); aus *Synechocystis*: Cph1; Cph2-GAF1 (N-terminale GAF-Domäne von Cph2); Cph2-GAF2 (mittlere GAF-Domäne von Cph2); Cph2-GAF3 (C-terminale GAF-Domäne von Cph2); PlpA; PixJ1-GAF1 (N-terminale GAF-Domäne von PixJ1); PixJ1-GAF2 (C-terminale GAF-Domäne von PixJ1); Sll1473; Slr1212; Slr1393-G1 (N-terminale GAF-Domäne von Slr1393); Slr1393-G2 (mittlere GAF-Domäne von Slr1393); Slr1393-G3 (C-terminale GAF-Domäne von Slr1393); Slr1969. Das chromophorbindende Cystein findet sich an Position 61 des Sequenz-Alignments.

Das phytochromähnliche Protein **PlpA** (*phytochrome like protein A*; Cyanobase: sll1124) ist der erste potentielle Photorezeptor in *Synechocystis*, zu dem Resultate physiologischer Untersuchungen veröffentlicht wurden. Diese verdeutlichten, dass PlpA eine Funktion für das photoautotrophe Wachstum im BL ausübt (Wilde *et al.*, 1997). Die molekulare Ursache für den im BL beobachteten Phänotyp konnte jedoch bisher nicht geklärt werden. Das 1371 AS lange PlpA ist ein Multidomänen-Protein (Abb. 4). Der N-Terminus besitzt keine

Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Der mittlere Teil des Proteins besteht aus einer Reihe von PAS- und PAC-Domänen sowie einer GAF-Domäne mit einer begrenzten Ähnlichkeit (25 % Übereinstimmung, 45 % Ähnlichkeit) zu den Chromophor-Bindungsdomänen bekannter pflanzlicher Phytochrome. Die Fähigkeit von PlpA ein Chromophor zu binden, konnte bisher nicht gezeigt werden. Zwar ist das konservierte Cystein vorhanden, jedoch befindet sich an der Stelle des benachbarten Histidins ein Alanin (Abb. 5). Der C-Terminus besitzt Ähnlichkeit zu HK-Domänen. Dies lässt auf eine mögliche Signalweiterleitung über ein Zwei-Komponenten-System schließen. Der Response-Regulator von PlpA konnte noch nicht identifiziert werden. Das *plpA*-Gen bildet nicht wie *cph1* ein Operon mit einem ORF, der für einen Response-Regulator kodiert.

Das phytochromähnliche Protein **PixJ1** (auch TaxD1 oder PisJ1; *cyanobase*: sl10041) wurde durch die unabhängig voneinander arbeitenden Forschungsgruppen von M. Ikeuchi und A. Grossman in Zusammenhang mit Studien der lichtinduzierten Motilität von *Synechocystis* als ein Regulator der positiven Phototaxis entdeckt (Yoshihara *et al.*, 2000; Bhaya *et al.*, 2001a). Untersuchungen des Einflusses von Lichtintensität und Spektralfarbe auf das phototaktische Verhalten von *pixJ1-knockout*-Mutanten verweisen auf eine Rolle des PixJ1-Proteins als *low-fluence-response*-Photorezeptor, der die positive Phototaxis im roten Wellenlängenbereich reguliert (Ng *et al.*, 2003). Interessanterweise konnten Yoshihara und Ikeuchi (2004) eine Photokonversion des aus *Synechocystis* isolierten PixJ1-Proteins zwischen einer GL-absorbierenden und einer BL-absorbierenden Form dokumentieren.

In die Ausprägung der Motilität ist eine Vielzahl von Genen involviert. Teilweise sind diese, wie auch sl10041, in zwei großen Genclustern angeordnet. Die vorhergesagten Genprodukte dieser Gencluster besitzen Ähnlichkeit zu den Regulatorkomponenten der Chemotaxis (Che-Proteine) in Enterobakterien (Yoshihara *et al.*, 2002).

Wie Cph2 weist das PixJ1-Protein für Phytochrome eine vergleichsweise ungewöhnliche Domänenarchitektur auf (Abb. 4). Im Protein sind zwei GAF-Domänen mit Ähnlichkeit zu den chromophorbindenden GAF-Domänen pflanzlicher Phytochrome enthalten (Abb. 5), wobei ein Chromophor unbekannter Natur an die C-terminale Domäne gebunden wird (Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Neben der Sequenzähnlichkeit zu Phytochromen besitzt dieses Protein im C-terminalen Bereich Ähnlichkeit zu konservierten Domänen des Che-Proteins MCP. Die Methyltransferase CheR methyliert spezifische Glutamat-Reste in der MCP-Domäne (im Domänen-Suchprogramm Smart als MA-Domäne betitelt).

Die Entfernung der Methyl-Gruppe erfolgt durch die Methylesterase CheB. Jedoch konnte im *Synechocystis*-Genom kein CheR-Homolog gefunden werden, sodass eine Methylierung von PixJ1 fraglich ist (Yoshihara *et al.*, 2000).

Wie das Vorhandensein einer Transmembran-Domäne andeutet, könnte PixJ1 möglicherweise mit der Plasmamembran assoziiert sein. Im Fall des PixJ1-Homologs SepixJ aus *Synechococcus elongatus* konnte dies erfolgreich mittels Immunogold-Markierung nachgewiesen werden (Konou *et al.*, 2002).

## 1.4 Die BL-Rezeptoren

Bereits im 19. Jahrhundert dokumentierten Sachs und Darwin BL-Reaktionen von Pflanzen, wie Phototropismus und das Öffnen der Stomata (zitiert in Briggs und Christie, 2002). Trotzdem blieb die Suche nach der Identität der verantwortlichen Photorezeptoren lange Zeit erfolglos. Erst 1993 wurde das Cryptochrom 1 (Cry1) in *A. thaliana* entdeckt (Ahmad und Cashmore, 1993), welches für die BL-vermittelte Inhibition des Hypokotyllängenwachstums sowie für die Kontrolle der Anthocyanakkumulation in Keimlingen verantwortlich ist (Ahmad *et al.*, 1995). Die Phototropine, eine weitere Klasse von BL-Rezeptoren, wurden infolge genetischer Studien von *Arabidopsis*-Mutanten mit der Unfähigkeit des Hypokotyls zum Phototropismus identifiziert (Liscum und Briggs, 1995).

**Cryptochrome** besitzen Ähnlichkeit zu den DNA-reparierenden Photolyasen (Ahmad und Cashmore, 1993). Dies betrifft nicht nur die Aminosäuresequenz, sondern auch die Art der Chromophor-Kofaktoren und die lichtabhängige Arbeitsweise (Malhotra *et al.*, 1995). Das 70 bis 80 kDa große Cryptochrommolekül bildet zwei erkennbare Regionen aus: Über weite Bereiche des Proteins erstreckt sich die PHR-Domäne (*photolyase-related*) mit Sequenzähnlichkeit zu mikrobiellen Photolyasen (Ahmad und Cashmore, 1993). Am C-terminalen Ende des Cryptochroms aus Pflanzen befindet sich ein zusätzlicher Sequenzabschnitt variierender Länge. Dieser ist in Photolyasen nicht enthalten und besitzt keine große Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen (Lin, 2002). Jedoch scheint dieser Sequenzabschnitt im Fall von Cry1 und 2 aus *A. thaliana* für deren Funktion bedeutend zu sein (Ahmad *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2000). Experimente mit Fusionsproteinen von GUS ( $\beta$ -Glucuronidase) und der C-terminalen Domäne des Cry1- oder Cry2-Proteins aus *A.*

*thaliana* deuten auf eine Funktion dieses Proteinabschnitts bei der Weiterleitung des Signals (Yang *et al.*, 2000). Trotz seiner variablen Länge konnten drei Sequenz-Motive in dem C-terminalen Bereich sowohl in Cryptochromen aus höheren als auch aus niederen Pflanzen ermittelt werden, die zusammen die DAS-Domäne (**D**QXVP-**a**cidic-**S**TAES) bilden (Lin und Shalitin, 2003).

Photolyasen binden zwei verschiedene Kofaktoren. Im N-terminalen Bereich befindet sich entweder ein Pterin (Methenyltetrahydrofolat) oder ein Deazaflavin mit Lichtsammel-funktion. Die Anregungsenergie wird zu einem katalytisch wirkenden Chromophor (ein Flavinadeninnukleotid) am C-Terminus weitergeleitet (Cashmore *et al.*, 1999). Die meisten der für die Bindung des Chromophors wichtigen Aminosäuren sind auch in Cryptochromen konserviert (Lin, 2002).

Die Art der photochemischen Reaktion nach der Perzeption des Lichtreizes konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Photolyasen ist ein Photozyklus mit einer Elektronenübertragung zwischen Pterin und Flavinadeninnukleotid denkbar (Sancar, 2003). Über die weitere Signalübertragung ist bekannt, dass Cry1 aus *A. thaliana* direkt mit COP1 interagiert (Wang *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass COP1 eine E3-Ubiquitin-Ligase zum gezielten Abbau des Transkriptionsfaktors HY5 über ein 26S-Proteasom darstellt (Wang *et al.*, 2001). Eine Interaktion zwischen Phytochrom und Cryptochrom in *A. thaliana* wurde in Kapitel 1.2.3 beschrieben. Interessanterweise konnte Bouly *et al.* (2003) *in vitro* eine lichtstimulierte Autophosphorylierung eines Serin-Restes im Cry1 aus *A. thaliana* sowie eines Serin-Restes im Cry1 aus *Homo sapiens* nachweisen. Eine BL-abhängige Phosphorylierung des Cry1- und des Cry2-Proteins aus *A. thaliana* *in vivo* zeigten Shalitin *et al.* (2003) und (2002). Die tatsächliche Funktion dieser Autophosphorylierungsaktivität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Allerdings deuten bisherige Resultate von Cry1 und 2 daraufhin, dass die Phosphorylierung eine Rolle bei der Funktion sowie Stabilität beider Proteine spielt (Shalitin *et al.*, 2002; Shalitin *et al.*, 2003).

Der BL-Rezeptor Cryptochrom ist im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet. Kürzlich veröffentlichte Arbeiten lieferten Indizien für das Vorhandensein eines potentiellen Cryptochroms in *Synechocystis* (Cry; auch PhrB, *cyanobase*: sl11629) (Hitomi *et al.*, 2000; Ng und Pakrasi, 2001), welches einer neuen Cryptochrom-Klasse mit der Bezeichnung DASH (*Drosophila melanogaster*, *A. thaliana*, *Synechocystis*, *Homo sapiens*) zugeordnet werden konnte (Brudler *et al.*, 2003). Die phylogenetische Analyse von Cry aus *Synechocystis* zeigte eine nähere Verwandtschaft dieses Proteins zu Cryptochromen aus

Tieren als zu Cry1 und Cry2 aus *A. thaliana* (Brudler *et al.*, 2003). Die Bindung des Kofaktors Flavinadeninnukleotid konnte beschrieben werden (Hitomi *et al.*, 2000). Brudler *et al.* (2003) postulierten, dass das Cry als ein Repressor in der transkriptionellen Regulation in *Synechocystis* fungieren könnte.

Der zweite BL-Rezeptortyp **Phototropin** stellt ein Protein mit einer C-terminalen Serin/Threonin-Kinase und zwei chromophorbindenden PAS-Domänen im N-terminalen Bereich dar (Briggs und Christie, 2002). Die letzteren beiden Domänen gehören einer Untergruppe von PAS-Domänen an, die häufig Bestandteil von Proteinen sind, die durch Licht (*light*), Sauerstoff (*oxygen*) und Redoxpotential (*voltage*) reguliert werden und deshalb als eine eigene Gruppe mit der Bezeichnung LOV zusammengefasst wurden (Lin, 2002; Crosson *et al.*, 2003). Beide LOV-Domänen binden ein Flavinmononukleotid, welches nach Lichtanregung einen Photozyklus durchläuft. Während dieses Photozyklus geht der Flavinmononukleotid-Kofaktor eine Bindung mit der Sulfatgruppe eines Cysteins ein. Die daraus resultierende Konformationsänderung aktiviert wahrscheinlich die Serin/Threonin-Kinase, was eine Signalweiterleitung initiieren könnte (Briggs und Christie, 2002).

Ein phototropinkodierender ORF konnte in *Synechocystis* nicht entdeckt werden. Jedoch existiert im *Synechocystis*-Genom mindestens ein Gen (slr0359), dessen Genprodukt eine LOV-Domäne enthält. Hinsichtlich seiner Domänenarchitektur unterscheidet sich das Protein stark von den Phototropinen. Slr0359 stellt vielmehr ein Multidomänenprotein mit PAS-Domänen sowie einer GGDEF- und einer EAL-Domäne dar. Crosson *et al.* (2003) ordnet dieses Protein in die Gruppe der LOV-Phosphodiesterasen ein. Da das photoaktive Cystein sowie ein Großteil der mit dem Chromophor interagierenden Aminosäuren in der LOV-Domäne des Slr0359-Proteins vorhanden sind, postulieren die Autoren BL-Absorptionsfähigkeit dieser Domäne und eine Regulation der Proteinaktivität durch Licht.

Eine weitere BL-Photorezeptorfamilie stellen die **BLUF-Proteine** dar. Kennzeichnend für diese Klasse ist das Vorhandensein einer BLUF-Domäne (Gomelsky und Klug, 2002). Der bekannteste Vertreter ist AppA aus *Rhodobacter sphaeroides*, wo über die Bildung eines AppA-PpsR<sub>2</sub>-Komplexes die Expression von Photosynthesegenen in Abhängigkeit von der BL-Intensität sowie in Abhängigkeit vom Redox-Status der Zelle kontrolliert wird (Masuda und Bauer, 2002). Die chromophore Gruppe dieses Photorezeptors ist ein

Flavinadenindinukleotid, das nichtkovalent an die BLUF-Domäne am N-Terminus gebunden ist (Gomelsky und Kaplan, 1998; Gomelsky und Klug, 2002). Die initiiierende Photochemie und die signalauslösende Strukturänderung dieser Photorezeptorfamilie konnte noch nicht völlig aufgeklärt werden. BLUF-Proteine lassen sich in zwei Untergruppen einteilen: (1) komplexe Multidomänen-Proteine und (2) kurze Proteine bestehend aus der BLUF-Domäne und 30 bis 70 AS (Gomelsky und Klug, 2002). In die erste Untergruppe lässt sich das AppA einordnen sowie das PAC-Protein (*photoactivated adenyl cyclase*) aus *Euglena gracilis*, die photophobische Reaktionen dieser Alge reguliert (Iseki *et al.*, 2002). Zur zweiten Untergruppe gehört das Genprodukt von slr1694 aus *Synechocystis* mit bisher unbekannter Funktion.

Vertreter des BL-Rezeptortyps **Xanthopsin** sind das *photoactive yellow protein* (PYP) aus *Ectothiorhodospira halophila* mit der Funktion der Vermittlung photophobischer Reaktionen (van der Horst und Hellingwerf, 2004) sowie das PYP-Phytochrom-Fusionsprotein Prp aus *Rhodospirillum rubrum* (Jiang *et al.*, 1999). Die Absorption von Licht bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins über eine *trans-cis*-Isomerisierung des Chromophors *trans-p*-Coumarinsäure (Braatsch und Klug, 2004; van der Horst und Hellingwerf, 2004).

Die membranassoziierten **Rhodopsine** sind hauptsächlich als Lichtsensor und Ionenpumpe in Archaea (Spudich, 1998) sowie als Sehfärbstoff in Augen von Vertebraten bekannt (Garriga und Manyosa, 2002). Das Apoprotein Opsin bindet als Chromophor das lineare Polyen Retinal. Das Rhodopsin wird durch eine *trans-cis*-Isomerisierung des Retinals nach der Aufnahme eines Photons aktiviert (van der Horst und Hellingwerf, 2004). In *Halobacterium salinarium* steuern die Sensorrhodopsine I und II die Phototaxis dieses Archaeons (Spudich, 1998). In der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* wird die lichtinduzierte Motilität ebenfalls durch zwei Rhodopsine vermittelt (Sineshchenkov *et al.*, 2002; Beckmann und Hegemann, 1991). Weiterhin wurden opsinkodierende Gene in *Neurospora crassa* (Bieszke *et al.*, 1999) und in *Anabaena* sp. PCC 7120 (Jung *et al.*, 2003) gefunden.



## 1.5 Die lichtinduzierte Motilität

Verschiedene Cyanobaktérienspezies sind zu einer aktiven Ortsveränderung befähigt, wodurch günstigere Umgebungen aufgesucht werden können. Zu den Umweltfaktoren, die Motilität auslösen können, zählt das Licht. Die lichtinduzierte Motilität wird in verschiedene Bewegungstypen unterteilt, die als Phototaxis, Photokinese und photophobische Reaktion bezeichnet werden (Häder, 1979). Die Phototaxis beschreibt die gerichtete Bewegung entlang eines Lichtgradienten. Die Abhängigkeit der Laufgeschwindigkeit von der Lichtintensität wird Photokinese genannt. Photophobische Reaktionen beschreiben kurzzeitige Bewegungen, die durch ein plötzliches Ansteigen oder Absinken der Lichtintensität ausgelöst werden.

*Synechocystis* sp. PCC 6803 weist ebenfalls einen motilen Phänotyp auf. Die Zellen können sich vermutlich nicht frei im Wasser bewegen, sondern benötigen hierfür eine feste Oberfläche. Wie bei *Pseudomonas aeruginosa* (McBride, 2001) sind für die Fortbewegung der *Synechocystis*-Zellen sogenannte TypIV-Pili notwendig (Bhaya *et al.*, 1999; Bhaya *et al.*, 2000). Die Art der Bewegung wird als *twitching* oder *gliding motility* bezeichnet. Die Wanderungsgeschwindigkeit der *Synechocystis*-Zellen ist vergleichsweise langsam. So betrug die von Choi *et al.* (1999) ermittelte Höchstgeschwindigkeit  $15,8 \mu\text{m min}^{-1}$ .

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von Genen in *Synechocystis* identifiziert werden, deren Produkte für die Motilität notwendig sind (Bhaya *et al.*, 2001b; Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Aktionsstudien der lichtinduzierten Motilität deuten auf das Wirken mehrerer Photorezeptoren bei der Steuerung der Zellbewegung hin (Choi *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2003). Wie in Kap. 1.3.3 beschrieben wurde, konnte die Funktion des phytochrom-ähnlichen Proteins PixJ1 als ein Regulator der positiven Phototaxis nachgewiesen werden (Yoshihara *et al.*, 2000; Bhaya *et al.*, 2001a). Das PixJ1-kodierende Gen *sll0041* ist Bestandteil eines Genclusters, dessen Genprodukte Ähnlichkeit zu den Regulatorkomponenten der Chemotaxis in Enterobakterien CheY, CheW, CheA und MCP aufweisen (Yoshihara *et al.*, 2002). Das PixJ1-Protein entspricht hierbei dem MCP (*methyl-accepting chemoreceptor protein*) (Yoshihara *et al.*, 2000; Bhaya *et al.*, 2001a). Die übrigen durch dieses Gencluster kodierten Proteine zeigten sich ebenfalls als notwendig für die positive Phototaxis (Yoshihara *et al.*, 2002). Der *pilG*-Gencluster kodiert für Proteine, die für die Bildung der TypIV-Pili notwendig sind (Yoshihara *et al.*, 2002). Ein Pilus besteht hauptsächlich aus Pilin-Untereinheiten, die durch die *pilA*-Gene kodiert werden. Das

*Synechocystis*-Genom enthält mehrere *pilA*-Gene, von denen jedoch nur die Inaktivierung von *pilA1* zu einem Verlust der Motilität führte (Bhaya *et al.*, 1999; Yoshihara *et al.*, 2001; Bhaya, 2004). Die Proteine PilB1 und PilT1 werden als Motoren der Zellbewegung angesehen, indem sie die Extension und Retraktion der TypIV-Pili steuern (Bhaya *et al.*, 2000; Bhaya, 2004). Weiterhin konnte die Funktion der Serin/Threonin-Kinasen SpkA (Kamei *et al.*, 2001), SpkB (Kamei *et al.*, 2003) und SpkE (Kim *et al.*, 2004) sowie der Adenylat-Zyklase Cya1 (Terauchi und Ohmori, 1999) und des cAMP-Rezeptorproteins SYCRP1 (Yoshimura *et al.*, 2002b) in der Motilität nachgewiesen werden.

Obwohl bereits eine ganze Reihe von Genprodukten mit einer Funktion in der lichtinduzierten oder generellen Motilität identifiziert werden konnte, existieren noch viele offene Fragen: Welche Photorezeptoren spielen neben dem beschriebenen PixJ1-Protein für eine phototaktische Reaktion eine Rolle? Wie werden die verschiedenen Signale integriert? Wie löst die Signalkette die Bewegung der Zelle aus?

## 1.6 Zielstellung

Zu Beginn der Arbeit war die Funktion der beiden cyanobakteriellen Phytochrome Cph1 und Cph2 in *Synechocystis* unbekannt. Daher wurden Mutanten mit einem inaktivierten *cph1* bzw. *cph2*-Gen hergestellt. Desweiteren wurde eine Doppelmutante beider Gene erzeugt, um mögliche kompensatorische oder überlappende Funktionen von Cph1 und Cph2 aufzuspüren.

Die Aufklärung der Funktion der beiden Phytochrome beinhaltete eine Wachstumsanalyse unter verschiedenen Lichtqualitäten sowie Lichtintensitäten. Bei der Ergründung der Ursachen für die Wachstumsminde rung der Phytochrommutanten stand die Untersuchung der Photosynthese mit verschiedenen Methoden im Mittelpunkt. Dazu gehörten die Analyse der Pigmentzusammensetzung, die Messung der Sauerstoff freisetzung und die Aufnahme von 77K-Fluoreszenzspektren.

Einen weiteren Schwerpunkt stellte die Untersuchung der lichtgerichteten Motilität dar. Für *Synechocystis* wird angenommen, dass die Steuerung der Zellbewegung über mehrere Photorezeptoren erfolgt. Zu Beginn dieser Arbeit war in *Synechocystis* kein Photorezeptor mit einer Funktion in der Regulation der Motilität bekannt. Das phototaktische Verhalten der Phytochrommutanten wurde unter verschiedenen Lichtqualitäten untersucht. Die

Studien zur lichtgerichteten Motilität schlossen Mutanten weiterer photorezeptorkodierender Gene ein.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

3-Morpholino-Propansulfonsäure (MOPS)	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal)	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose DNA <sup>TM</sup>	Biozym Diagnostik GmbH, Hameln
Ammoniumeisen-III-citrat	Fluka-BioChemika, Steinheim
Ampicillin	Boehringer GmbH, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg
Chloramphenicol (Cm)	Boehringer GmbH, Mannheim
Chloroform	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dextran	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg
Dikaliumhydrogenphosphat	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg
Formaldehyd	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Formamid	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerol	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Isopropanol	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Isopropylthio- $\beta$ -D-Galaktosid (IPTG)	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Kaliumchlorid (KCl)	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg
Kanamycin (Km)	Boehringer GmbH, Mannheim
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Methanol	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
MOPS	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumkarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumnitrat (NaNO <sub>3</sub> )	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Phenol	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris	C. Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Trizol	Gibco/BRL, Life Technologies, New York, USA
Zinksulfat	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Chemapol, Prag, Tschechische Republik

### 2.1.2 Radiochemikalien

[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Spez. Aktivität: 110 Tbq mmol <sup>-1</sup>	
Volumenkapazität: 370 Mbp ml <sup>-1</sup>	

### 2.1.3 Enzyme

AmpliTaQ-Polymerase	Perkin Elmer, Warrington, GB
CIAP ( <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> )	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Klenow-Fragment ( <i>large</i> )	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
LA Taq-Polymerase	TAKARA Bio Europe S. A., Gennevilliers, Frankreich
Lysozym	GERMED, Berlin
Proteinase K	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot New England Biolabs GmbH, Schwalbach
RNase A/T1-Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
SAP ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
T4-DNA Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Qiagen GmbH, Düsseldorf

#### 2.1.4 Nukleinsäuren

Oligonukleotide	Eurogentec, Köln Metabion GmbH, Martinsried TIB MOLBIOL, Berlin
Random Hexamers	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Lambda-DNA	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Marker	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

**Tab. 1: Verwendete Plasmide.**

Plasmid	Eigenschaft	Bezugsquelle oder Referenz
pACYC184	Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
pQE12	Amp <sup>R</sup>	Qiagen GmbH, Düsseldorf
pUC4K	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
puc19	Amp <sup>R</sup>	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
pVZ321	IncQ, <i>mob</i> <sup>+</sup> , Km <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Zinchenko <i>et al.</i> (1999)
RP4	Amp <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	Datta <i>et al.</i> (1971)

**Tab. 2: Für PCR- und Sequenzierungsreaktionen eingesetzte Primer.** Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben. Die in den mutagenisierenden Primern ausgetauschten Nukleotide sind fett gedruckt und unterstrichen.

	Name	Sequenz (5' → 3')
Standardprimer	FW	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
	RV	TTCACACAGGAAACAGCTATGAC
<i>cph1</i> -Primer	P1	TGCAGGAACCAGACCTCACC
	P2	GGGATGGAGAAGTAGAATGTGG
	Phy100left	CATCCAGAGTCGCCTAACG
	Phy100right	CCGTCACTGTTGCGATGA
<i>cph2</i> -Primer	P3	CGGGATCCAACCCTAATCGATCCTTAG
	P4	GAAGATCTAAGTTCCCCATCAACATG
	cph2-5L	CGGGGCAAATAGAACGAAAT
	cph2-3955R	GATAAGGGCCCTTAAAACAGG
	cph2-3955L	CCTGTTTTTAAGGGCCCTTATC
	cph2-4900R	CCAAGGGGAAGGGATTAATTT
	cph2HpaIFW	GGCAGAGGCAGTTAACAGAGCTGC
	cph2MphRV	TCGTTTCCAATGCATACTGCCAGG
	cph2SwaIFW	CTCCACCGTCACCGAAGTGAGGC
	cph2Eco91IRV	GTAGCGGTTACCCACTTGGGTGAGGG
	cph2-370RV	GACAACTATCCACTGTTGTGTAATGGC
	cph2-490FW	GTAAACCCGGGCGATTTACCG
	cph2-490RV	CGGTAAATCGCCCGGGTTTAC
	cph2-560FW	CTGGCCATTACCCAGTCC
	cph2-640FW	GTATGGCGATCGTCCGGAAC
	cph2-1150RV	AGGAAAGACGGGGCAGAATA
	cph2-1820RV	CCAACGTCAGGCGATCG
	cph2-3500FW	GCCAAAAGACCAACGGATTAG
Mutagenisierende	C129	CAGTGGATAG <u>CGCT</u> CATATTCAATATCTCC
Primer:	cph2-129RV	GGAGATATTGAATATGAG <u>CGCT</u> ATCCACTG
	C1022	GACTTGGCGGAC <u>GT</u> CCACAAGGAGTTAC
	cph2-1022RV	GTAATCCTTGTGG <u>ACG</u> TCCGCCAAGTC
Weitere Primer	16S100left	AAGTCATCATGCCCCTTAC

Name	Sequenz (5' → 3')
16S100right	ATGGGATTCGCTTACTCTC
pilA(+)	CGGTGTATTGGCTGCTAT
pilA(-)	TTCAGCACCACCACAATCAT
slr0359FW	GGACAAGGGAGGAAAGACCT
slr0359RV	CTATCCCCATGGCATTCTGT
slr0846FW	GATGGGCAAGGATGGCTTCT
slr0846RV	TTAGCCCGATCGCCTAACAA
slr1693FW	TAAGGCCGGGGAAATTAGTC
slr1969FW	ATTTCTCCCCACCATTATGC
slr1969RV	TCCTGCTGGATACTCTGCAC
sll0041FW	GCGCTCTTTTTACTGGGTTG
sll0041RV	GTCTGGGTCACCGATTCACT
sll1553FW	GTAAACATGACCCGGAGTGG
sll1629FW	CAAGCTTTCAATCCTTTTGCTT
sll1629RV	TGCCCAGATTGCACTAATTG
ISY100FW	TTTAAGGCAAAGGGTAGTAGCTT
ISY100RV	CGCCACAGTAAGAACGGATA
ISY120FW	TGAGCGTGTTACTGGGAGACT
ISY120RV	GTATGAGAGGCGCCAGTTG
ISY203FW	TAGACCAGAGCCAGACAAGC
ISY203L-RV	GCTTGTCTGGCTCTGGTCTA
ISY352FW	TCAAGAGAAAAACCTTCCCAGA
ISY352RV	TTTTTGATTCCACCAAGGATG
ISY391FW	CAAAGACAAGAGAGGCGAAAA
ISY391RV	TCCAAAACATGAGCAAATGG
ISY508FW	TTTCATCGAGAGTGGTGGTG
ISY508RV	AGTACCGGAAGGTGCGTACA
ISY523FW	ACAGCACGGACATCACAGAT
ISY523RV	CAAGCCTTTGAAGCATGAGA
ISY802FW	TATGCGAGCGGTTTGTAATG



Name	Sequenz (5' → 3')
ISY802RV	TAGCAGAAAGACGACGCAAC
pVZ321-Km1403	GAAGGATCAGATCACGCATCTTCCCGAC

### 2.1.5 Kits

DNAfree kit	Ambion, Austin, Texas, USA
HexaLabel™DNA Labeling Kit	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Jet-Sorb Gel Extraction Kit	Genomed GmbH, Bad Oynhausen
Omniscript	Qiagen GmbH, Düsseldorf
pGEM-T Vector System I	Promega Corporation, Madison, USA
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Düsseldorf
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Düsseldorf
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen GmbH, Düsseldorf
Qiagen Taq DNA Polymerase PCR Kit	Qiagen GmbH, Düsseldorf
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Düsseldorf
Ready Reaction BigDye Terminator Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
SYBR-Green Kit	PE Applied Biosystems, Weiterstadt

### 2.1.6 Filter und Membranen

Hybond™ N <sup>+</sup> - Membranen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HATF-Nitrozellulose Membranen	Millipore Corporation, Bedford, USA
3MM-Filterpapier	Whatman Paper Ltd., Maidstone, GB
PTFE - Filter	Millipore Corporation, Bedford, USA
Filter (0,25 µm Porengröße)	Schleicher & Schüll, Dassel

### 2.1.7 Technische Geräte

Aquarium Durchlüfter ELITE 800	HAGEN, Holm
Automatischer Sequenzierer: ABI Prism 377 DNA Sequencer	PE Applied Biosystems, Weiterstadt

## DNA Sequencer

Brutschrank	Qiagen GmbH, Düsseldorf
Elektrophoresekammer Modelle MPH und QSH	International Biotechnologies Inc. (IBI), New Haven, USA
Elektrophoresekammer, Modell Medigel	Genofit SA, Grand-Lancy, Frankreich
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Gene Amp® 5700 Sequence Detection System	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
GS Gene Linker™ UV Chamber	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Heizblock SHT1	Stuart Scientific Co. Ltd., GB
HPLC	Waters GmbH, Eschborn
Hybridisierungsöfen	Bachofer GmbH, Reutlingen
Kühlzentrifuge J2-21M, Rotoren JA-20, JA-14	Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Laborwaage MC1	Sartorius AG, Göttingen
Laminarbox	Nuaire, Plymouth, USA
Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus, Hanau
Peltier Thermal Cycler PTC-200	Biozym Diagnostik GmbH, Hameln
pH-Meter Phi32	Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA
Phospho-Imager Personal Molecular Imager FX	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Reinstwasseranlage Milli-RO 10/Milli-Q Plus	Millipore Corporation, Bedford, USA
RNA/DNA Calculator Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Sauerstoffelektrode	Rank Brothers Ltd., Bottisham, GB
Schreiber L200E	Linseis GmbH Meßgeräte GmbH, Selb
Spektrofluorimeter Fluorolog FL-112	Jobin-Yvon, Longjumeau, Frankreich
Spektrophotometer M500	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Spektrophotometer Lambda35	PerkinElmer Instruments, Shelton, USA
Stromversorgungsgerät Power Pack 300	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Tischzentrifuge Sorvall MC 12C	DuPont de Nemours (Deutschland) GmbH, Bad Homburg
Transilluminator TFP-35M, 312 nm	Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich
Vakuum-Blotter Modell 785	BioRad Laboratories, Richmond, USA
Vortex Genie 2™	Bender & Hohlbein AG, Zürich, Schweiz

Die Beschreibung der Belichtungsanlage sowie die verwendeten Lichtmessgeräte finden sich in den Kapiteln 2.2.5.1 und 2.2.6.

## 2.1.8 Verwendete Bakterienstämme

### 2.1.8.1 Stämme von *Synechocystis*

Die Photorezeptormutanten wurden in *Synechocystis* sp. PCC 6803 hergestellt, einem fakultativ photoheterotrophen Cyanobakterium der Ordnung *Chroococcales* mit natürlicher Kompetenz zur Transformation und sporadisch auftretender Motilität. Das Genom besitzt eine Größe von 3,57 Mbp mit annotierten 3168 ORFs (Kaneko *et al.*, 1996).

Der von uns hauptsächlich verwendete WT-Stamm von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde von der Arbeitsgruppe S.V. Shestakov (Staatliche Universität Moskau, Lehrstuhl für Genetik, Russland) zur Verfügung gestellt. Für die Analyse der IS-Elemente wurden Varianten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 aus verschiedenen Laboratorien eingesetzt. Diesen WT-Varianten wurden Nummern zugeordnet. Eine Aufschlüsselung der WT-Stämme nach Nummer und Bezugsquelle findet sich in Tab. 3. Die zu Beginn der Arbeiten vorhandenen Mutanten echter oder potentieller Photorezeptorgene sind in Tab. 4 aufgelistet.

**Tab. 3: Bezugsquellen verschiedener WT-Stämme.** Diese wurden für die Analyse der IS-Elemente im *Synechocystis*-Genom sowie für Motilitätsuntersuchungen eingesetzt. Die in dieser Tabelle aufgestellte Nummerierung der WT-Stämme stimmt mit der in Kap. 3.5 des Ergebnisteils überein. Die Nr. 6 entspricht dem WT, der für die Inaktivierung der Gene *cph1* und *cph2* verwendet wurde.

Nummer des WT-Stammes	Bezugsquelle
1	F. Chauvat, Service de Bioénergétique, Département de Biologie Joliot Curie, CEA Saclay, France
2	A.R. Grossman, Carnegie Institution of Washington, Department of Plant Biology, Stanford, USA
3	Kazusa Research Institute, Japan
4	R. Rippka, Institut Pasteur Paris, France

Nummer des WT-Stammes	Bezugsquelle
5	M. Hagemann, Universität Rostock, FB Biowissenschaften, Pflanzenphysiologie
6	S.V. Shestakov, Staatliche Universität Moskau, Abteilung für Genetik, Russland
7	D. Scanlan, University of Warwick, Department of Biological Sciences, UK
8	W. Vermaas, Arizona State University, Department of Plant Biology and Center for the Study of Early Events in Photosynthesis, USA

**Tab. 4: Photorezeptormutanten von *Synechocystis*. Diese Mutanten waren bereits zu Beginn dieser Arbeit vorhanden.**

Gen	Bezeichnung	Antibiotika-kassette	Einbauort	Verwendung
<i>cph1</i> (slr0473)	<i>cph1</i> <sup>-</sup>	Cm	Ball-Ball ( <i>sense</i> - Ausrichtung)	Wachstumsanalyse, Konstruktion einer <i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup> -Doppelmutante
<i>cph2</i> (sll0821)	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	Cm	StuI ( <i>antisense</i> - Ausrichtung)	Wachstumsanalyse, Konstruktion einer <i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup> -Doppelmutante
<i>plpA</i> (sll1124)	<i>plpA</i> <sup>-</sup>	Km	EcoRI-EcoRI	Phototaxisexperimente
sll1473	<i>1473</i> <sup>-</sup>	Cm	BsaBI	Phototaxisexperimente
slr1393	<i>1393</i> <sup>-</sup>	Cm	BsaBI-BsaBI	Phototaxisexperimente

Für die Insertion der Antibiotikaresistenzgen-Kassetten zur Herstellung der in Tab. 4 aufgeführten *cph1*<sup>-</sup>(Cm)- und *cph2*<sup>-</sup>(Cm)-Mutanten wurden folgende Konstrukte verwendet:

Das PCR-Produkt von *cph1* wurde in den puc57-Vektor (Fermentas) kloniert. *Cph2* wurde in den pQE12-Vektor (Qiagen) eingefügt. Diese Konstrukte wurden ebenfalls zur Insertion der Km-Kassette verwendet. Eine detailliertere Beschreibung der Mutagenese von slr0473 (*cph1*) und sll0821 (*cph2*) findet sich in Wilde *et al.* (2002). Die Konstruktion der *plpA*<sup>-</sup>-Mutante wurde in Wilde *et al.* (1997) beschrieben.

### 2.1.8.2 Stämme von *E. coli*

Für Klonierungen wurden folgende Stämme von *E. coli* verwendet:

- XL1-blue (Stratagene, Amsterdam, NL): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F'*proAB lacI<sup>n</sup>ZAM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]
- Top10 (Invitrogen, Groningen, NL): *recA1*, *endA1*, F<sup>-</sup>, *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *f80lacZAM15*,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *nupG*
- J53 (Datta *et al.*, 1971) *pro met* ( $\lambda$ ), RP4

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte unter Standardbedingungen (Sambrook *et al.*, 1989). *E. coli* wurde bei 37 °C entweder als Flüssigkultur in LB-Medium (1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl) auf einem Schüttler (220 rpm) oder auf einem LB-Festmedium (LB-Medium, 1 % (w/v) Bacto-Agar) angezogen. Je nach Bedarf wurden dem Medium Antibiotika mit folgenden Endkonzentrationen zugefügt: Ampicillin (50 µg ml<sup>-1</sup>), Chloramphenicol (Cm, 25 oder 30 µg ml<sup>-1</sup>), Kanamycin (Km, 40 µg ml<sup>-1</sup>) und Tetracyclin (12,5 µg ml<sup>-1</sup>).

Die Anzucht von *Synechocystis* erfolgte photoautotroph in BG11-Medium (Rippka *et al.*, 1979) unter kontinuierlichen Weißlicht-Bedingungen (WL, 30 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) bei 30 °C. Für die Stammhaltung und Selektion von Mutanten wurde *Synechocystis* auf 0,7 % Bacto-Agar in BG11-Medium kultiviert. In Kolben gehaltene Flüssigkulturen wurden mit 100 bis 150 rpm geschüttelt. Die Endkonzentration der eingesetzten Antibiotika betrug 40 µg ml<sup>-1</sup> für Km und 7 µg ml<sup>-1</sup> für Cm.

Die Kultivierungsbedingungen in Zusammenhang mit der Analyse des Wachstums und der Untersuchung der lichtinduzierten Motilität sind gesondert in den Kapiteln 2.2.5.1 bzw. 2.2.6.1 beschrieben.

## 2.2.2 Konstruktion von Mutanten in *Synechocystis*

### 2.2.2.1 Allgemeine Methoden

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurde nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. In Abhängigkeit von der Fragmentlänge der DNA wurden 0,8 %ige bis 1,5 %ige (w/v) TAE(1x)-Agarosegele mit TAE (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA pH 8,0) als Laufpuffer eingesetzt. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde den Agarosegelen 0,001 % Ethidiumbromid zugesetzt. Die Beladung der Gele mit DNA erfolgte mittels eines Ladepuffers (30 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (w/v) Xylencyanol).

Die Amplifikation von Genen bzw. Genabschnitten erfolgte nach der Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR). Für die Herstellung von Konstrukten zur Erzeugung von Defektmutanten in *Synechocystis* sowie für die Gewinnung von DNA-Sonden wurde die Taq-Polymerase von Qiagen eingesetzt. Zur Synthese von möglichst fehlerfreien DNA-Abschnitten wurde die LA-Taq-Polymerase von TAKARA verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktion sowie das Temperatur-Zeit-Programm für die Inkubation im Peltier Thermal Cycler PTC-200 (Biozym) richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers. Die eingesetzten Primer sind in Tab. 2 aufgelistet. Die erzielten PCR-Produkte wurden unter Verwendung des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach dem Protokoll der Erzeugerfirma von den Primern abgetrennt.

Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden unter Verwendung des pGEM-T Cloning Kit (Promega) in den Vektor pGEM-T eingebaut.

Der Verdau der DNA durch entsprechende Restriktionsenzyme sowie die Elution der gewünschten DNA-Fragmente aus Agarosegelen unter Verwendung geeigneter Kits (Qiagen Gel Extraction Kit, Qiagen; Jet-Sorb Gel Extraction Kit, Genomed) wurde nach den Angaben der Hersteller ausgeführt. Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurde das Klenow-Fragment (*large*, Fermentas) und dNTP's entsprechend des Firmenprotokolls eingesetzt. Zur Reduktion der Anzahl falschpositiver Klone wurden die Enden geschnittener Vektoren mittels SAP (USB) oder CIAP (Fermentas) gemäß den Herstellerangaben dephosphoryliert.

DNA-Fragmente wurden mittels T4-DNA-Ligase (Fermentas) ligiert. Die eingesetzten

Mengen an Vektor und Insert orientierten sich an folgender Gleichung:

$$\text{Masse}_{\text{Fragment}} = \frac{5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} \times \text{Länge}_{\text{Fragment}}}{\text{Länge}_{\text{Vektor}}}$$

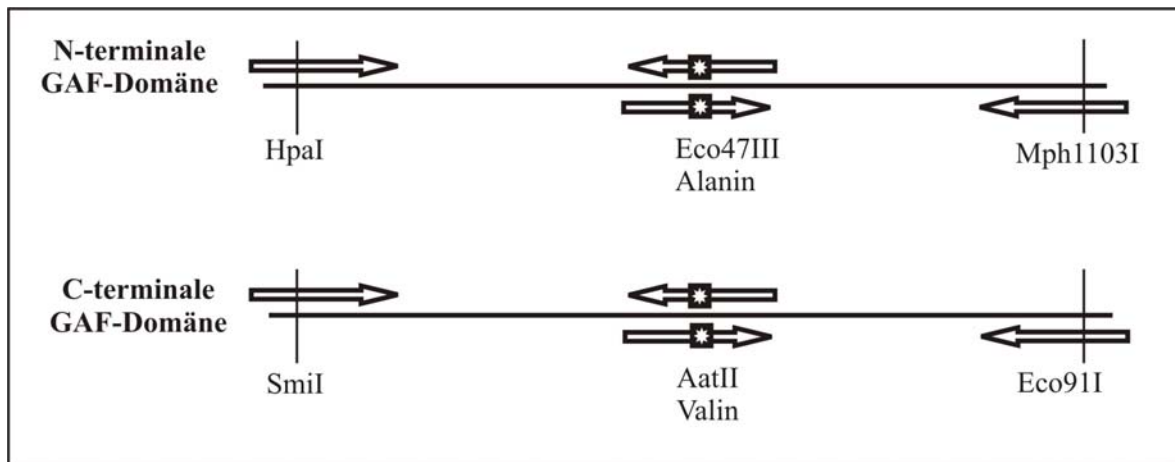
Ligationsansätze wurden nach Sambrook *et al.* (1989) in chemisch kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1-blue transferiert, die nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt wurden. Transformierte Zellen wurden mittels Zugabe der entsprechenden Antibiotika selektiert. Im Fall der Klonierung von PCR-Produkten wurden positive Klone über Blau-Weiß-Selektion durch den Zusatz von 40 µl IPTG (20 mg ml<sup>-1</sup> in H<sub>2</sub>O) und 40 µl X-Gal (20 mg ml<sup>-1</sup> in DMF) identifiziert.

Die Isolation der Plasmide ist in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben.

#### 2.2.2.2 Konstruktion von Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese

Zusätzlich zu den Deletions- bzw. Insertionsmutanten des *cph2*-Gens wurden Mutanten erzeugt, bei denen das chromophorbindende Cystein über ortsgerichtete Mutagenese durch eine andere Aminosäure ausgetauscht wurde.

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde durch eine PCR mit mutagenisierenden Primern kombiniert mit Primern (Tab. 2), die an bereits vorhandene Restriktionsschnittstellen binden, erzielt (Abb. 6). Das cysteinkodierende Kodon innerhalb der mutagenisierenden Primer wurde so verändert, dass neben einer neuen Aminosäure auch eine neue Restriktionsschnittstelle zum vereinfachten Aufspüren der gewünschten Klone entstand (Eco47III für GAF1 und AatII für GAF3). In einer ersten PCR (Taq-Polymerase, Qiagen) wurden zwei kurze Fragmente *upstream* sowie *downstream* vom Mutagenisierungsort amplifiziert. Diese beiden Fragmente wurden als *template* zusammen mit den beiden äußeren Primer in einer zweiten PCR eingesetzt. Aufgrund der überlappenden Bereiche im Mutagenisierungsort wurden die beiden kürzeren Fragmente zu einem neuen verlängertem Produkt verschmolzen. Das neu synthetisierte Produkt wurde in den pGEM-T-Vektor eingebaut. Mit Hilfe der beiden vorhandenen Schnittstellen wurde das mutationstragende Fragment gegen das entsprechende WT-Fragment über Restriktionsverdau ausgetauscht.



**Abb. 6: Position der Primer für die Konstruktion von *cph2*-Mutanten mittels ortsgerichteter Mutagenese.** Das chromophorbindende Cystein im N-terminalen Bereich wurde durch ein Alanin ausgetauscht, das Cystein im C-terminalen Bereich durch ein Valin.

#### 2.2.2.3 Erstellen einer Mini-Genbank

Für die Herstellung einer Mini-Genbank von *Synechocystis* wurde die chromosomale DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten. Die fragmentierte DNA wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. DNA-Banden im gewünschten Größenbereich wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eluiert (Kap. 2.2.2.1; Qiagen Gel Extraction Kit). Das eluierte Fragment wurde in den mit dem gleichen Restriktionsenzym linearisierten puc19-Vektor (New England Biolabs) inseriert. Mit dem gewonnenen Konstrukt wurde anschließend *E. coli* transformiert. Die Auffindung des gewünschten Klonen erfolgte über Kolonie-Hybridisierung (Kap. 2.2.4.3). Nach Vermehrung der Plasmid-DNA wurde diese sequenziert und für weitere Klonierungen eingesetzt.

#### 2.2.2.4 Transformation von *Synechocystis*

Die Transformation erfolgte nach einer von Ermakova *et al.* (1993) beschriebenen Methode.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4500 rpm, 7 min, 25 °C) aus 5 ml Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und in ca. 100 µl BG-11 aufgenommen. Anschließend wurden 5 bis 10 µg Plasmid-DNA der Zellsuspension zugefügt. Das resultierende Gemisch wurde für 3 bis 4 h im Licht bei Raumtemperatur inkubiert und während dieser Zeit mehrfach invertiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch auf ein antibiotikafreies BG-11-Festmedium (2.2.1) ausplattiert und bei 28 °C und  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$



inkubiert. In Abhängigkeit vom Selektionsantibiotikum wurde nach 24 h  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  Km oder nach 48 h  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  Cm unter einen Teil der Agarplatte zugegeben, so dass durch langsames Diffundieren des selektiven Agens ein Konzentrationsgradient entstand. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Transformanten vereinzelt und auf Festmedien mit schrittweise steigender Antibiotikumkonzentration bis zum Erreichen des Endwertes von  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  für Km und  $7 \mu\text{g ml}^{-1}$  für Cm überführt.

### 2.2.2.5 Konjugation

Der konjugale Transfer der Plasmid-DNA erfolgte über eine sogenannte „Drei-Eltern-Kreuzung“. Als Cargo-Plasmid wurde das sich in *Synechocystis* autonom replizierende, *mob*<sup>+</sup>-tragende pVZ321-Plasmid (in *E. coli*-Stamm XL-1 blue) verwendet. Als konjugatives Plasmid diente RP4 (in *E. coli*-Stamm J53).

In Vorbereitung der Konjugation wurden jeweils 0,25 ml einer Übernachtskultur von J53/RP4 und XL1-blue/pVZ321 in einer Zwischenkultur (10 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika; 2,5 h, 37°C, Schüttler) vermehrt. Nach Abzentrifugieren der *E. coli*-Zellen (5 min, 2500 rpm, Raumtemperatur) wurde das Pellet in 1 ml LB-Medium aufgenommen. Beide *E. coli*-Stämme wurden anschließend im Verhältnis 1:1 gemischt, abzentrifugiert (2500 rpm, 5 min, Raumtemperatur) und das Zellpellet in 0,1 ml LB-Medium aufgenommen. Während des folgenden Inkubationsschrittes (1h, 30°C) wurde das konjugative RP4-Plasmid in den XL1-blue/pVZ321-Stamm transferiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden 1,9 ml einer *Synechocystis*-Kultur (OD 0,6-0,8) der *E. coli*-Suspension zugefügt, abzentrifugiert (2500 rpm, 5 min, Raumtemperatur) und das resultierende Zellpellet in 30  $\mu\text{l}$  BG11-Medium resuspendiert. Anschließend wurde das *Synechocystis*/*E. coli*-Gemisch auf einen HATF-Filter (auf BG11-Festmedium mit 5 % LB-Medium platziert) aufgetropft. Nach 2 d Wachstum wurden die Zellen auf eine  $3 \mu\text{g ml}^{-1}$  Cm enthaltende Selektionsplatte transferiert.

## 2.2.3 **Isolation von Nukleinsäuren**

### 2.2.3.1 Isolation der Gesamt-DNA aus *Synechocystis*

Die Gesamt-DNA wurde nach Franche und Damerval (1988) isoliert. Hierfür wurden ca. 200 ml einer *Synechocystis*-Kultur am Ende der logarithmischen Wachstumsphase ab-

zentrifugiert (6000 rpm, 7 min, 4 °C). Die geernteten Zellen wurden zweimal in 40 ml TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen. Für einen osmotischen Schock der Zellen wurde das Zellpellet in 4 ml TES-Puffer (25 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert und der gesamte Ansatz kurzzeitig in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C nach Zugabe von 5 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym und 100 mM EDTA aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zelllysate für 1 h bei 60 °C (alternativ: 16 h und 37 °C) mit 3,2 U Proteinase K (Fermentas) und 2 % SDS behandelt. Die Nukleinsäuren wurden mit Phenol/Chloroform (1:1 (v/v)) von den Zellresten extrahiert. Hierfür wurden gleiche Volumina von Zellextrakt und Phenol/Chloroform gemischt. Die obere Phase wurde nach 15minütiger Zentrifugation (6000 rpm, 4 °C) abgezogen und erneut mit Phenol/Chloroform gereinigt. Eventuelle Phenolreste in der wässrigen Phase wurden nach Zugabe von Chloroform im Verhältnis 1:1 und anschließender Zentrifugation (6000 rpm, 15 min, 4 °C) beseitigt. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert (Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur; Zentrifugation: 13000 rpm, 30 min, 4 °C). Das gewonnene DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und für 1 h luftgetrocknet. Die DNA wurde in 30 bis 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Beseitigung der RNA erfolgte enzymatisch mittels 2 µl RNase A/T1-Mix (Fermentas) (30 min, 37 °C; Hitzeinaktivierung: 10 min 72 °C).

### 2.2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* und *Synechocystis*

Die Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse isoliert (Sambrook *et al.*, 1989). *High-copy*-Plasmide wurden aus Zellpellets (5000 rpm, 7 min, 4 °C) von 3ml-Übernachtskulturen extrahiert. Die alkalische Lyse erfolgte unter Verwendung der entsprechenden Puffer aus kommerziellen Kits (Qiagen Plasmid Mini Kit, Qiagen GmbH; High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche Diagnostics GmbH) nach dem von der Firma empfohlenen Protokoll. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol gefällt und wie in Kap.2.2.3.1 beschrieben behandelt. Zur Sequenzierung bestimmte Plasmid-DNA wurde über Säulen aus dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen GmbH) nach dem entsprechenden Protokoll der Hersteller-Firma gereinigt.

*Low-copy*-Plasmide wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH) aus Zellpellets von 50ml-Kulturen gewonnen.

Für die Präparation des pVZ321-Plasmides aus *Synechocystis* wurden die Zellen aus 400 ml Kultur (OD ca. 0,8 bis 1,5) durch Zentrifugation (6000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde zweimal in 50 ml TE-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 3 ml TES-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 5 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym und 100 mM EDTA lysiert (Inkubation: 30 min, 37 °C). Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurde dem Lysat 2 % SDS zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 10 min auf Eis gelagert. Dem folgte die Zugabe von 0,2 M KCl und eine Inkubation für 10 min auf Eis. Nach Zentrifugation des Zelllysates (6000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand mit Phenol/Chloroform, wie in Kap. 2.2.3.1 beschrieben behandelt und die DNA mittels Isopropanol gefällt (siehe Kap. 2.2.3.1). Neben der Plasmid-DNA enthielt das Präparat auch chromosomale DNA.

### 2.2.3.3 Präparation von RNA aus *Synechocystis*

Für die Isolation von RNA wurden Zellkulturen aus der exponentiellen Wachstumsphase für 1 oder 2 h unter verschiedenen Lichtbedingungen inkubiert. Unmittelbar nach Ablauf der Belichtungszeit wurden ca. 25 ml Zellkultur zu einer ähnlichen Menge Eis gegeben und abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Zellaufschluss bei -80 °C gelagert. Für die Untersuchung der mRNA-Menge von *pilA1/pilA2* wurden die *Synechocystis*-Zellen direkt von Platten aus den Motilitätsexperimenten (Kap. 2.2.6.1) gewonnen, die unter konstanten Lichtbedingungen gehalten wurden. Die auf diesem Weg gewonnen Zellen wurden ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Gesamt-RNA aus *Synechocystis* wurde mit Trizol nach den Instruktionen der Herstellerfirma isoliert. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Trizol in Mörserbechern, die vorher mit flüssigem Stickstoff gekühlt wurden, pulverisiert. Nach einer 20 bis 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz mit 200 µl Chloroform intensiv vermischt. Die Proben wurden zunächst bei Raumtemperatur für 15 min gelagert und anschließend abzentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4 °C). Die entstandene obere Phase wurde abgenommen und die RNA mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert (Zentrifugation: 13000 rpm, 30 min, 4 °C). Das RNA-Pellet wurde mit 70 %igen (v/v) Ethanol gewaschen und nach Lufttrocknung in 20 bis 40 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

Die für die Reverse Transkription bestimmte RNA wurde nach einem leicht

modifizierten Protokoll isoliert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Trizol pulverisiert und die Menge an Chloroform auf 400 µl verdoppelt.

### 2.2.3.4 Spektrophotometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen

Die Ermittlung der Konzentration von DNA und RNA erfolgte über die Messung der Optischen Dichte (OD) an einem Spektrophotometer (RNA/DNA Calculator Gene Quant II, Amersham) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration wurden die Umrechnungsfaktoren für doppelsträngige DNA (1 OD entspricht 50 µg ml<sup>-1</sup>) sowie für RNA (1 OD entspricht 40 µg ml<sup>-1</sup>) einbezogen. Die Reinheit der Nukleinsäuren wurde über den Quotienten aus der Bestimmung der OD bei 260 und 280 nm abgeschätzt.

## 2.2.4 **Analyse von Nukleinsäuren**

### 2.2.4.1 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Die Sequenzierungsreaktion wurde unter Verwendung des Ready Reaction BigDye Terminator Kits (PE Applied Biosystems) nach Herstellervorgaben angesetzt und enthielt in Abhängigkeit von der Plasmidgröße 0,7 oder 1 µg DNA sowie 1 µM Primer (Tab. 2). Nach Ablauf der Synthesereaktion wurde die DNA durch Zugabe von 1 Volumen Präzipitationspuffer (30 µg ml<sup>-1</sup> Dextran, 50 mM EDTA) sowie 96 %igem Ethanol im Verhältnis 10:1 gefällt. Das nach Zentrifugation (13 000 rpm, 30 min, 15 °C) entstandene Pellet wurde in 150 µl 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen und in 1,7 µl Ladepuffer (PE Applied Biosystems) aufgenommen. Die Analyse der Sequenz erfolgte in einem automatischen Sequenzierer (ABI Prism 377 DNA Sequencer, PE Applied Biosystems) durch die Firma DLMBC.

### 2.2.4.2 Markierung von DNA-Sonden

Die DNA-Sonden wurden über die *random-oligonucleotide-prime*-Methode mit dem Hexa-Label™DNA Labeling Kit's (Fermentas) markiert. Für die Reaktion wurden 100 ng DNA sowie 1,85 MBq (50 µCi) [α-<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham) eingesetzt. Das Protokoll wurde

nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die zur Herstellung einer Sonde verwendete DNA wurde auf zwei Wegen gewonnen: (1) Amplifikation über PCR und Aufreinigung des Produktes mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (Kap. 2.2.2.1) oder (2) Restriktion von Konstrukten über geeignete Enzyme und Elution des gewünschten Fragmentes aus einem Agarosegel (Kap. 2.2.2.1).

### 2.2.4.3 Southern-Blot-Analyse

In Vorbereitung für den Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten DNA auf Hybond™ N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham) wurden die Agarosegele zur Erzeugung von DNA-Strangbrüchen mit UV-Licht (312 nm, 60 mJ, 60 s; GS Gene Linker™) bestrahlt. Der DNA-Transfer erfolgte unter Verwendung eines Vakuum-Blotters (Modell 785, BioRad). Während des Blottens wurden die Agarosegele mit Lösungen in folgender Reihenfolge behandelt: Denaturierung mittels 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl (30 bis 40 min) und Neutralisierung mittels 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)/1,5 M NaCl (30 bis 40 min). Anschließend wurde die Membran in 2x SSC (20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) für 2 min äquilibriert. Nach dem Trocknen der Membran wurde die DNA durch Einwirken von UV-Licht (312 nm, 150 mJ, 150 s; GS Gene Linker™) mit dem Filter vernetzt.

Prähybridisierung und Hybridisierung der Filter erfolgte in einem Hybridisierungssofen (Bachofer) in speziellen Glasröhren. Die Filter wurden in einem Hybridisierungspuffer (0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,2)/ 7 % (w/v) SDS) bei 65 °C für 30 min prähybridisiert. Nach Zugabe der Sonde wurde bei gleicher Temperatur 4 h oder über Nacht hybridisiert. Die ungebundene sowie die unspezifisch gebundene Sonde wurde durch folgende Waschschritte von der Membran entfernt: zweimal 15 min in 2x SSC/ 0,5 % SDS bei Raumtemperatur, anschließend zweimal 15 min in 0,1x SSC/ 0,1 % SDS bei 65 °C.

Die vom Filter ausgehende Strahlung wurde über die *storage-phosphor*-Technologie an einem Phospho-Imager erfasst, wobei sich die Exponierungsdauer der Filter nach der Stärke der radioaktiven Strahlung richtete. Das Einscannen der kristallbeschichteten Schirme und die Auswertung der Daten erfolgte am Phospho-Imager Personal Molecular Imager FX (BioRad Laboratories).

#### 2.2.4.4 Koloniehybridisierung

Bakterienkolonien, die den Vektor mit dem gewünschten Insert enthielten, wurden mittels Koloniehybridisierung (Grunstein-Hogness-Technik) identifiziert. Die Bakterien wurden von Agarplatten auf Hybond<sup>TM</sup>N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham) transferiert und die Zellen durch Behandlung der Membran mit 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl (5 min, Raumtemperatur) lysiert. Anschließend wurde der Filter zweimal 5 min in 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)/1,5 M NaCl neutralisiert. Nach Entfernung der Zellreste und Waschen der Membran in 2x SSC wurde die DNA durch UV-Licht (312 nm, 150 mJ, 150 s; GS Gene Linker<sup>TM</sup>) mit dem Filter vernetzt. Prähybridisierung und Hybridisierung wurde wie im oberen Abschnitt beschrieben durchgeführt.

#### 2.2.4.5 Northern-Blot-Analyse

Die Übertragung der RNA aus denaturierenden Agarosegelen auf Hybond<sup>TM</sup>N<sup>+</sup>-Membranen (Amersham) erfolgte über Kapillartransfer. Die Agarosegele zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA hatten folgende Zusammensetzung: 1,2 % (w/v) Agarose, 4 % (v/v) Formaldehyd, 1x MEN-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA pH 8,0). Vor dem Beladen eines Agarosegels wurde die RNA in 2x Ladepuffer (95 % (v/v) Formamid, 0,025 % (v/v) SDS, 0,5 mM EDTA, 0,4 % (v/v) Ethidiumbromid) aufgenommen und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Der Laufpuffer enthielt 1xMEN.

Für den RNA-Transfer wurde das Agarosegel mit der Oberseite nach unten auf einer Pufferbrücke angeordnet, die aus mehreren Lagen 3MM-Whatman-Papier bestand. Die Hybond<sup>TM</sup>N<sup>+</sup>-Membran wurde auf die ursprünglichen Unterseite gelegt. Zur Erzeugung eines Flüssigkeitsstromes durch das Agarosegel in Richtung Membran wurde ein ca. 10 cm hoher Stapel aus trockenem 3MM-Whatman- und Filter-Papier auf die Membran geschichtet und mittels einer Glasplatte und eines Gewichtes (ca. 500 bis 800 g) fixiert. Der Transferpuffer bestand aus 10x SSC. Der Transfer vollzog sich über eine Zeitspanne von ca. 16 h. Anschließend wurde die Membran in 2x SSC für ca. 3 min äquilibriert und nach dem Trocknen zur Vernetzung der RNA mit dem Filter mit UV-Licht (312 nm, 150 mJ, 150 s; GS Gene Linker<sup>TM</sup>) behandelt.

Prähybridisierung und Hybridisierung (16 h) erfolgten in einem Formamid-Puffer (50 %

(v/v) Formamid, 7 % (w/v) SDS, 0,12 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2, 0,25 M NaCl) bei 55 °C. Die DNA-Sonde (zur Markierung siehe Kap. 2.2.4.2) wurde nach Ablauf der 30 minütigen Prähybridisierung zugegeben. Im Anschluss an die 16 stündige Hybridisierung wurden die RNA-Filter nach folgendem Protokoll gewaschen: 15 min in 2x SSC/ 1 % SDS bei Raumtemperatur, anschließend zweimal 15 min in 0,1x SSC/ 0,1 % SDS bei 55 °C.

## 2.2.4.6 Quantitative *real-time* RT-PCR

Die mRNA-Menge schwach transkribierter Gene wurde mit der Quantitativen *real-time* RT-PCR bestimmt. Im ersten Schritt wurde die nach einem leicht modifizierten Protokoll präparierte RNA (Kap. 2.2.3.3) mit Hilfe des DNAfree Kit (Ambion) nach den Instruktionen des Herstellers von möglichen Verunreinigungen durch DNA befreit. Die cDNA wurde aus 500 ng Gesamt-RNA unter Verwendung der Reversen Transkriptase Omniscript (Qiagen) und zufällig bindender Hexamerprimer (Random Hexamers, PE Applied Biosystems) synthetisiert. Vor dem Syntheseschritt wurde die RNA für 5 min bei 65 °C denaturiert. Dem folgte eine 2 minütige Inkubation bei Raumtemperatur zur Anlagerung der Hexamerprimer. Nach Zugabe der Reversen Transkriptase wurde der Reaktionsansatz für 60 min bei 37 °C und anschließend für 5 min bei 93 °C inkubiert. Dem Kontrollansatz wurde keine Reverse Transkriptase zugefügt. Zum Schutz vor RNA-Degradation enthielt der Reaktionsansatz 1,6 U  $\mu\text{l}^{-1}$  Ribonuclease Inhibitor (Fermentas).

Für die Bestimmung der *cph1*- und der *cph2*-Transkriptmenge wurden jeweils 10 bis 40 ng der umgeschriebenen RNA als Triplikate für die Quantitative PCR eingesetzt. Im Fall der als Bezugsgröße dienenden 16S rRNA wurde diese Menge auf 10 bis 40 pg reduziert. Die Negativkontrollen aus der Reversen Transkription lagen nur als Unikate vor. Für das Ansetzen der PCR wurde der SYBR-Green Kit (PE Applied Biosystems) unter Berücksichtigung der Herstellervorgaben verwendet. Außerdem enthielt der Ansatz 400 nM der entsprechenden Primer. Die Primerpaare wurden so gewählt, dass PCR-Produkte mit einer Länge von 90 bis 110 Basenpaaren (bp) entstehen. Die PCR fand mit dem folgenden Programm statt: 10 min Denaturierung und Enzymaktivierung bei 95 °C, 40 Zyklen mit je 10 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Anlagern der Primer bei 60 °C und 45 s Elongation bei 72 °C. Die PCR und die zeitliche Erfassung der Produkte erfolgte in einem Gene Amp® 5700 Sequence Detection System in Kombination mit der dazugehörigen Software (Version 1.3) (PE Applied Biosystems). Die Transkriptmenge wurde mit nachstehender Gleichung

berechnet:

$$\text{Transkriptmenge} = 2^{-\Delta Ct}$$

Der für die Quantifizierung notwendige Ct-Wert entspricht der Anzahl von Zyklen bei einem festgelegten Fluoreszenzsignal in der exponentiellen Phase der Produktvermehrung in der PCR. Die Fluoreszenz wird von entsprechend markierten Nukleotiden aus dem SYBR-Green Kit nach dem Einbau in eine doppelsträngige DNA emittiert.

## 2.2.5 Wachstumsanalyse

### 2.2.5.1 Kultivierungsbedingungen

Für die Aufnahme von Wachstumskurven wuchsen WT und Phytochrommutanten in einer *batch*-Kultur mit Luftbegasung bei 30 °C in BG11-Medium (Rippka et al., 1979). Die Belichtung der Kulturen erfolgte kontinuierlich. Intensität und Qualität des Lichtes (WL-Fluoreszenzlampen; TDL58W/865, Philips) wurde unter Verwendung spezieller Plastikfilter (Lee Filters, Undover, GB) reguliert. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm am Spektrophotometer (Lambda35) erfasst.

Die Vorkultur erfolgte unter mittleren Lichtbedingungen (ML, 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Lee-Filter Nr. 210). Dem Medium der Phytochrommutanten wurde die entsprechende Menge Antibiotikum (2.2.1) zugesetzt.

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurden die Kulturen nach Erreichen einer  $\text{OD}_{750\text{nm}}$  von ca. 0,8 auf 0,15 verdünnt. Anschließend wurden die Kulturen mit kontinuierlichem Starklicht (HL, 165  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), ML, Schwachlicht (LL, 6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Lee-Filter Nr. 210 und 211), BL (12  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Lee-Filter Nr. 119), GL (8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Lee-Filter Nr. 090), RL (15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Lee-Filter Nr. 106) und FRL (0,3  $\text{W m}^{-2}$ ; Lee-Filter Nr. 106 und 119) belichtet. Zum Erzeugen von FRL wurde zusätzlich zu den Fluoreszenzlampen ein Halogenscheinwerfer eingesetzt. Die Lichtstärke von WL und RL wurde mittels des Sensors 190SA (LI-COR, Bad Homburg) gemessen, die Intensität des FRL hingegen unter Verwendung des Pyranometersensors LI-200SA (LI-COR). Die Spektralverteilung der aufgeführten Lichtbedingungen wurde mittels der hoch auflösenden

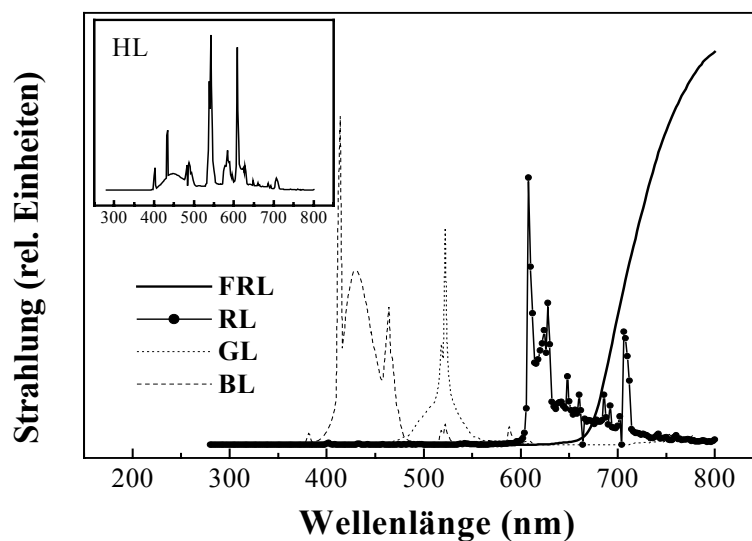


Spektroradiometer SR-9910 (Macam Photometrics Ltd, Livingston, GB) und LI-1800UW (LI-COR, Inc., Lincoln Nebraska, USA) erfasst und ist in Abb. 7 dargestellt.

Die Zugabe von Antibiotika zum Medium könnte das Auftreten von scheinbar phänotypischen Effekten bewirken. Um dies zu verhindern, wurde den Kulturen während der Wachstumsanalyse kein Antibiotikum zugefügt.

#### 2.2.5.2 Berechnung der Wachstumsrate

Zur Analyse des Wachstums wurde über einen bestimmten Zeitraum die OD spektrophotometrisch bei 750 nm ermittelt. Die Häufigkeit der Probennahme richtete sich nach der Verdopplungsgeschwindigkeit der Zellen. Die Wachstumsrate wurde in der exponentiellen Wachstumsphase als linearer Anstieg des natürlichen Logarithmus der OD gegen die Zeit bestimmt. Die Wachstumsraten der Phytochrommutanten wurden als Prozentwert der WT-Kontrolle dargestellt.



**Abb. 7: Spektralverteilung des für Wachstumsanalysen und Phototaxisstudien (Kap. 2.2.6) genutzten Lichtes.**

#### 2.2.5.3 Kompetitionsexperimente

Zur Bestätigung der Resultate aus der Bestimmung der lichtabhängigen Wachstumsrate wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierbei wurden WT und Mutante

gemeinsam in einem Anzuchtskolben kultiviert und die zeitliche Verschiebung des Anteils der Mutantenzellen in der Mischkultur bestimmt.

Der Vorkultur im ML folgte eine Zwischenkultur, in der sich die Kulturen an die zu testenden Lichtbedingungen akklimatisieren sollten. Nach Erreichen einer  $OD_{750nm}$  von 0,5 bis 0,8 wurde die Zellzahl mittels eines Hämozytometers kalkuliert (Thoma, Bad Blankenburg), die Zellen von WT und *cph1<sup>-</sup>*- bzw. *cph2<sup>-</sup>*-Mutante wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf eine  $OD_{750nm}$  von ca. 0,15 verdünnt. Die Häufigkeit der Probennahme erfolgte in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit im Abstand von 2 bis 6 Tagen. Die Proben wurden in zwei bzw. drei Verdünnungsstufen auf Km-haltige bzw. antibiotikafreie Platten mit 6 ml Top-Agar (BG11, 0,75 % (w/v) Bacto-Agar) ausplattiert. Nach ca. zwei Wochen wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Auf den antibiotikafreien Platten wuchsen sowohl WT- als auch Mutanten-Kolonien, während auf den Km-haltigen Agarplatten nur Mutantenzellen überleben konnten. Die Mutantenzellen wurden als prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet.

### 2.2.5.4 Bestimmung von Photosyntheseparametern

#### 2.2.5.4.1 Analyse der Pigmentzusammensetzung

Die Bestimmung der Pigmentzusammensetzung und des Pigmentgehaltes wurde an einer HPLC (Waters GmbH, Eschborn) mit dem Prinzip der „*Reversed Phase Chromatography*“ durchgeführt. Durch diese können die Pigmente Chlorophyll a (Chl a), Zeaxanthin (Zea),  $\beta$ -Karotin ( $\beta$ -Car), Myxoxanthophyll (Myx) und Echinenon (Ech) analysiert werden.

Für die Bestimmung der Pigmentzusammensetzung wurden 2 ml der Zellkulturen aus der logarithmischen Phase abzentrifugiert und die Zellpellets bei -20 °C gelagert. Die Pigmente wurden durch die Zugabe von 0,5 oder 1 ml Methanol und anschließender lichtgeschützter Inkubation für 1h auf Eis extrahiert. Die gewonnenen Extrakte wurden über PTFE - Membranfilter mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m (Millipore) von Zelltrümmern abgetrennt. Das Injektionsvolumen lag, abhängig von der Pigmentkonzentration, bei 150 oder 200  $\mu$ l. Alle beschriebenen Arbeiten fanden unter abgeschwächtem Licht statt.

Das Waters HPLC-System bestand aus einem Photodiodenarray-Detektor (Waters PDA 996), dem Waters 717plus Autosampler mit einem Heizungs-/Kühlungsaggregat zur Kühlung des Probenraumes und einem Pumpensystem (Waters 600E *system controller* und

Waters 600 *fluid unit*). Die Auftrennung der Pigmente erfolgte über eine C<sub>18</sub>-Säule (Waters *Spherisorb 5µ ODS2 Column* 4,6 x 250 mm) in Verbindung mit einer Vorsäule (Waters *Guard – Pak Inserts Resolve C<sub>18</sub>*) und einem Waters RCM 8 x 10 Modul bei Raumtemperatur. Der Laufmittelgradient ergab sich aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen von Laufmittel (LM) A (Acetonitril : H<sub>2</sub>O : Triethylamin; 1800 : 200 : 2) und LM B (Ethylacetat). Der LM-Gradient zur Auftrennung der Pigmente hatte das folgende Muster: 16 min isokratisch 100 % LM A; 18 min linearer Gradient von 100 % LM A zu 100 % LM B; 3 min isokratisch 100 % LM B; 4 min isokratisch 100 % LM A. Die Dauer des Proben durchlaufs durch die HPLC betrug 41 min bei einer Flussrate von 1,0 ml min<sup>-1</sup>. Die Daten wurden durch einen Computer mit der HPLC - Software Millenium 2010 Version 2.00 (Millipore) registriert und ausgewertet. Die Kalibrierung erfolgte durch Pigmentstandards (VKI, Hörsholm, Dänemark). Für die Bestimmung des Eichfaktors für Myx und Ech waren keine Pigmentstandards verfügbar. Hierfür wurden die beiden Pigmente aus einem Pigmentextrakt über die HPLC aufgereinigt. Die in die Berechnung des Pigmentgehaltes eingehenden Eichfaktoren sind in Tab. 5 aufgelistet.

**Tab. 5: Eichfaktoren für die HPLC-Pigmentbestimmung.**

Pigment	Eichfaktor	Retentionszeit (min)
Myx	$8,7 \times 10^{-5}$	18
Zea	$6,2 \times 10^{-5}$	20
Chl a	$15,0 \times 10^{-5}$	26
Ech	$12,2 \times 10^{-5}$	28
β-Car	$6,6 \times 10^{-5}$	35

Die Menge eines Pigmentes berechnet sich aus der Peakfläche, dem Injektions- und dem Extraktvolumen. Die qualitative Analyse der Pigmente erfolgte über die Erfassung des Absorptionsspektrums im Peakmaximum und der Retentionszeit. Beides wurde mit den Daten bekannter Substanzen aus einer Spektrenbibliothek verglichen.

#### 2.2.5.4.2 Bestimmung des Phycocyanin/Chlorophyll a - Verhältnisses

Das Verhältnis von Phycocyanin (PC) zu Chlorophyll a (Chl) wurde aus den Absorptionsspektren ganzer Zellen ermittelt, welche an dem Spektrophotometer M500 mit einem Einsatz für streuende Proben aufgenommen wurden (Carl Zeiss Jena GmbH). Die Berechnung erfolgte nach der in Myers *et al.* (1980) beschriebenen Formel:

$$PC/Chl = \frac{1,0162 \times OD_{630nm} - 0,2612 \times OD_{680nm}}{1,0162 \times OD_{680nm} - 0,063 \times OD_{630nm}}$$

#### 2.2.5.4.3 Aufnahme von 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren

Die Fluoreszenz-Emissionsspektren von WT und Phytochrommutanten wurden bei 77 K und einer Anregungswellenlänge von 440 nm mit einem Spektrofluorimeter Fluorolog FL-112 mit einem 1680 Emissionsdoppelmonochromator (Jobin-Yvon) aufgenommen. Eine auf ca. 5 µg Chl eingestellte Zellsuspension, bestehend aus 300 µl in BG11-Medium aufgenommenem Zellmaterial und 700 µl Glycerin, wurde in Form von Kügelchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heiko Lokstein am Max-Born-Institut (Berlin) durchgeführt.

#### 2.2.5.4.4 Messung der Sauerstofffreisetzung

Die Sauerstofffreisetzung wurde von Zellkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase ermittelt. Eine Küvette mit integrierter Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ (Rank Brothers Ltd.) wurde mit 4 ml Zellkultur und 5 mM Natriumhydrogenkarbonat beladen. Die Messung erfolgte bei 30 °C unter Lichtsättigung. Die Sauerstoffentwicklung wurde über einen Schreiber erfasst und nach der in diesem Kapitel genannten Formel berechnet. Für die Kalibrierung der Sauerstoff-Elektrode wurde der Schreiberausschlag bei Sauerstoffsättigung nach intensiver Luftdurchmischung von 4 ml Wasser sowie der Schreiberausschlag am Nullpunkt der Sauerstoffkonzentration nach Natriumdithionit-Zugabe bestimmt.

$$\text{Rate} = \frac{\Delta_{\text{Messung}} \times \text{Verstärkung}_{\text{Messung}} \times L \times \text{Volumen}_{\text{Eichung}}}{\Delta_{\text{Eichung}} \times \text{Verstärkung}_{\text{Eichung}} \times \text{Volumen}_{\text{Küvette}} \times t \times \text{Bezugsgröße}}$$

$\Delta$  stellt die Änderung des prozentualen Sauerstoffanteils dar. L entspricht der temperaturabhängigen Sauerstoffsättigungskonzentration ( $0,23 \mu\text{mol ml}^{-1}$  bei  $30^\circ\text{C}$ ). Die Zeit t ergab sich aus dem Schreibervorlauf. Als Bezugsgröße diente die Masse an Chl im Messvolumen.

## 2.2.6 Untersuchung der Phototaxis

### 2.2.6.1 Phototaxis-Assay

Der Einfluss von Cph1 und Cph2 auf das phototaktische Verhalten von *Synechocystis* wurde getestet, indem WT- und Mutantenzellen auf Agarplatten einem Lichtgradienten ausgesetzt wurden. Diese Platten setzten sich aus BG11, 0,5 % (w/v) Bacto-Agar und 5 mM Glukose zusammen. Der Lichtgradient wurde mit Hilfe einer *black box* mit einer Öffnung an der Vorderseite geschaffen. Vor diese Öffnung wurden Plastikfilter (Lee Filters, Undover, GB) befestigt, um BL (Lee-Filter Nr. 119), GL (Nr. 090), RL (Nr. 106) und FRL (Nr. 119+106) zu erzeugen. Als Lichtquelle dienten WL-Fluoreszenz-Lampen (TDL58W/865; Philips). Die in den Boxen herrschende Lichtintensität wurde mit Hilfe der Lichtsensoren LI-190SA für WL ( $1,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), BL ( $1,3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und GL ( $0,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sowie LI-200SA (beide LI-COR, Bad Homburg) für RL ( $0,3 \text{ W m}^{-2}$ ) und FRL ( $0,2 \text{ W m}^{-2}$ ) gemessen. Die Spektralverteilung der aufgeführten Lichtbedingungen ist in Abb. 7 dargestellt. Die Zellen wurden in drei Entfernungen von der Lichtquelle aufgetragen, wobei das Licht von 100 % an der ersten Position auf 60 % an der zweiten und 35 % an der dritten Position reduziert wurde.

Neben den hauptsächlich genutzten Plastikfiltern wurden für die Phototaxis-Assays Photodioden (Tab. 6) sowie für BL eine Kombination aus einem blauen dichroischen Filter (Edmund Scientific, Barrington, USA) und einem UV 418 *cut-off*-Filter (Schott Glaswerke, Mainz) verwendet.

Tab. 6: Verwendete Photodioden.

LED	Firma
LED-UV (373 nm), RLT 370-TO-18	Roithner Lasertechnik, Österreich
LED-blau (466 nm), TL HB5100	Conrad Electronic GmbH, Hirschau
LED-grün (565 nm), TLHG 5800	Conrad Electronic GmbH, Hirschau
LED-rot, LED-Scheinwerfer CLUSTER-52MM	Conrad Electronic GmbH, Hirschau
LED-dunkelrot (720 nm), ELD-720-524	Roithner Lasertechnik, Österreich

#### 2.2.6.2 Aufnahme eines Aktionsspektrums der BL-gesteuerten Motilität

Für eine detailliertere Untersuchung des phototaktischen Verhaltens des *Synechocystis*-WTs im blauen Spektralbereich wurden Interferenzfilter eingesetzt, die Licht in einem eingeschränkten Wellenlängenbereich transmittieren. Die durchschnittliche Halbwertsbreite dieser Filter betrug 10 bis 20 nm. Die Lichtbedingungen dieser Experimente sind in Tab. 7 aufgelistet. Als Kontrolle wurde zusätzlich die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante aufgetragen. Die Lichtintensitäten lagen zwischen 1 und 3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Die Filter mit einem Transmissionsmaximum von 451 bis 504 nm wurden von der Arbeitsgruppe Schlodder von der TU Berlin bereitgestellt.

**Tab. 7: Interferenzfilter mit Wellenlänge des Transmissionsmaximums und verwendeter Lichtquelle.**

Wellenlänge (nm)	Firma	Lichtquelle
372 <sup>a)</sup>	Schott Glaswerke, Mainz	Projektorlampe <sup>b)</sup>
405	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena	Solux-Lampe <sup>c)</sup>
436	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena	Solux-Lampe
451	Schott Glaswerke, Mainz	Solux-Lampe
461	Schott Glaswerke, Mainz	Solux-Lampe
474	Schott Glaswerke, Mainz	Halogenscheinwerfer
484	Schott Glaswerke, Mainz	Halogenscheinwerfer
494	Schott Glaswerke, Mainz	Halogenscheinwerfer
504	Schott Glaswerke, Mainz	Halogenscheinwerfer

a) Dieses Experiment wurde an der Philipps-Universität Marburg durch Dr. Tatjana Kleine ausgeführt.

b) Prado Universal 31047 (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar)

c) Eiko Europe GmbH, Germersheim

#### 2.2.6.3 Untersuchung der TypIV-Pili mittels Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopische Analyse der TypIV-Pili fand in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. G. Tischendorf (FU Berlin, Institut für Biologie/ Pflanzenphysiologie) statt. Die Pili wurden mittels Metallbedampfung kontrastiert. Hierfür wurden aus Phototaxis-experimenten stammende Zellen von dem WT und der *cph2*-Mutante verwendet, und zwar jeweils unter WL gelaufene sowie nichtmotile Zellen von WT und der Phytochrommutante. Genauso wurde mit der *cph2*-Mutante unter BL-Bedingungen verfahren. Im Fall des BL-bestrahlten WT wurden Zellen von der lichtzugewandten sowie von der lichtabgewandten Seite genutzt. Die genannten Zellen wurden mittels EM-Objektträgern (Kupfernetze von 3 mm Durchmesser) von der Agarplatte in der vorgegebenen, meist stark konzentrierten Form abgetupft und unmittelbar in ein Fixativ (6 % Formaldehyd in 100 mM Natrium-

/Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,0) übertragen. Nach vorsichtiger Vereinzelung der Zellen in diesem Medium wurden sie dort für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Die chemisch fixierten Zellen wurden dann in einem Stufen-Gradienten (obere Phase: 6 % Formaldehyd in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7; untere Phase: 0,1 M Saccharose, 6 % Formaldehyd in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7) aufgetrennt und als Fraktionen gesammelt. Die Zellen aus den verschiedenen Fraktionen wurden auf negativ-geladene EM-Trägernetze (mit Pioloform beschichtete und mit Kohle bedampfte Kupfernetze) übertragen. Diese EM-Trägernetze wurden in einem Siemens-Bedampfungsgerät (Siemens AG, Berlin) mit Platin-Palladium in einem Winkel von 45° bedampft. Die elektronenmikroskopische Aufnahme der schräg beschatteten Pili erfolgte mit einem Siemens TEM 101 (Siemens AG).

## 2.2.7 Computeranwendungen

**Tab. 8: Liste der verwendeten Computerprogramme und Internetanwendungen.**

Programm bzw. Internetadresse	Beschreibung
Gene Amp® 5700 SDS Software (Version 1.3; PE Applied Biosystems, Weiterstadt)	Erfassung und Auswertung der Daten aus der Quantitativen <i>real-time</i> RT-PCR
Quantity One (BioRad Laboratories, Richmond, USA)	Software des Phospho-Imagers
SeqEd™ (Version 1.0.3; PE Applied Biosystems, Weiterstadt)	Auswertung von Sequenzierungsdaten
CLUSTALX (Version 1.8)	Erstellen eines Sequenz-Alignments
GENEDOC (Version 2.6.002)	Bearbeitung eines Sequenz-Alignment
<a href="http://www3.ncbi.nlm.nih.gov">http://www3.ncbi.nlm.nih.gov</a>	Allgemeine Datenbank für Genom- und Proteinforschung
<a href="http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html">http://www.kazusa.or.jp/cyano/cyano.html</a>	Cyanobase: <i>Synechocystis</i> -Datenbank
<a href="http://smart.embl-heidelberg.de">http://smart.embl-heidelberg.de</a>	Vorhersage der Domänenarchitektur von Proteinen
<a href="http://www.firstmarket.com/cgi-bin/cutter">http://www.firstmarket.com/cgi-bin/cutter</a>	Auffinden von Erkennungsstellen von Restriktionsendonukleasen in einer DNA-Sequenz



### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Konstruktion der *cph1*- und der *cph2-knockout*-Mutante

Für die Untersuchung der Funktion der cyanobakteriellen Phytochrome Cph1 und Cph2 wurden durch den Einbau von Antibiotikaresistenzgen-Kassetten verschiedene Deletions- und Insertionsmutanten erzeugt. Da die Insertion eines Antibiotikaresistenzgens, unabhängig vom inaktivierten Gen, phänotypische Effekte verursachen könnte, wurden Km-resistente und Cm-resistente Mutanten von beiden Phytochromen untersucht.

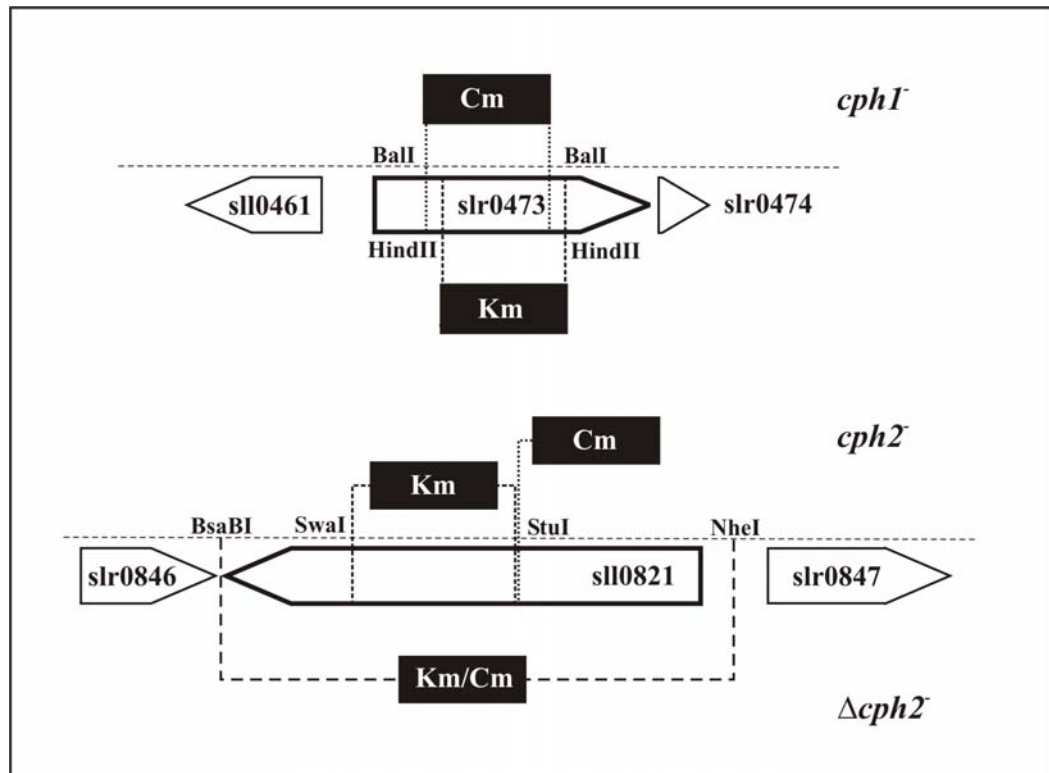
Zur Inaktivierung von *cph1* (slr0473) wurde die Cm-Resistenzgen-Kassette zwischen zwei Ball-Restriktionsschnittstellen in *sense*-Richtung zum Gen eingefügt, die Km-Resistenzgen-Kassette hingegen wurde zwischen zwei HindIII-Restriktionsorte sowohl in *sense* als auch in *antisense*-Richtung eingebaut (Abb. 8). Für die Mutagenese von *cph2* (sll0821) wurde die Cm-Resistenzgen-Kassette in *antisense*-Ausrichtung in den StuI-Restriktionsort und die Km-Resistenzgen-Kassette in beiden Orientierungen zwischen die Restriktionsstellen StuI und SwaI inseriert (Abb. 8). Eine detailliertere Beschreibung der Mutagenese beider Phytochromgene findet sich bei Wilde *et al.* (2002).

Um mögliche kompensatorische oder überlappende Funktionen von Cph1 und Cph2 zu erfassen, wurde eine *cph1*/*cph2*-Doppelmutante konstruiert. Hierfür wurden die Konstrukte, die eine Km-Resistenzgen-Kassette enthalten, in die entsprechende Cm-resistente *cph1*- bzw. *cph2*-Einzelmutante von *Synechocystis* transferiert.

Für die Untersuchung der Phototaxis wurde eine weitere *cph2*-Mutante konstruiert, bei der das *cph2*-Gen in seiner gesamten Länge durch eine Km- oder Cm-Kassette ersetzt wurde. Zu diesem Zweck wurde *cph2* sowie die flankierenden Bereiche mittels der Primerpaare *cph2*-5L/*cph2*-3955R, *cph2*-3955L/*cph2*-4900R und slr0846FW/slr0846RV (Tab. 2) amplifiziert und die resultierenden PCR-Produkte in den pGEM-T-Vektor (Promega) kloniert. Anschließend wurden die verschiedenen Fragmente mittels geeigneter Restriktionsorte (ApaI und BsaBI) zusammengefügt. Die Antibiotikaresistenzgen-Kassetten wurden in *sense*- und *antisense*-Ausrichtung zu *cph2* zwischen die Restriktionsorte NheI und BsaBI eingebaut (Abb. 8).

Die Transformation der genannten Konstrukte erfolgte wie bei Ermakova *et al.* (1993) beschrieben. Die Transformanten wurden auf der Basis der entsprechenden Resistenz

selektiert und mittels PCR oder Southern-Blot-Analyse charakterisiert. Für alle Gene konnten homozygote Mutanten durch den Einbau von jeweils einer Kopie des entsprechenden Konstrukts gewonnen werden.

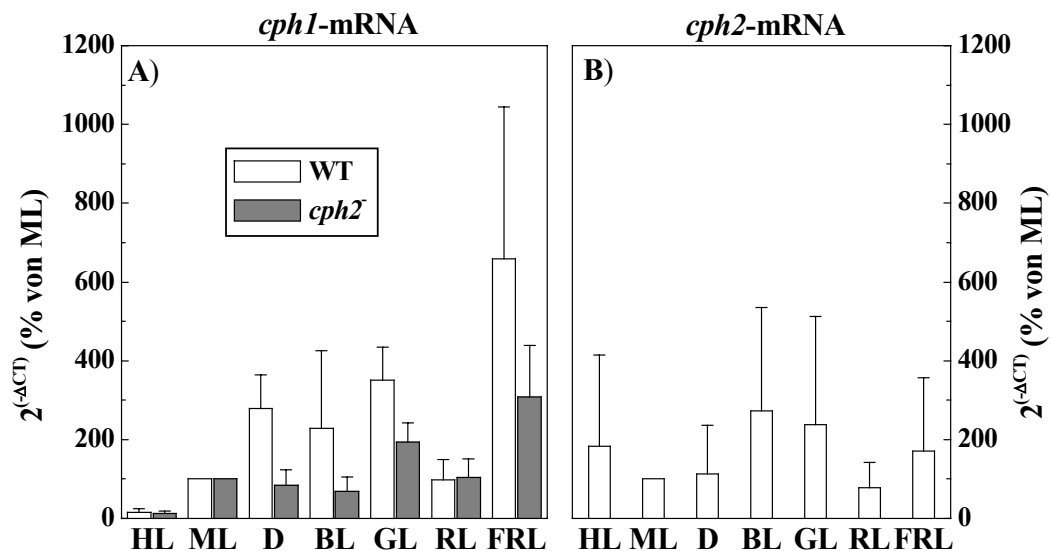


**Abb. 8: Schema zur Mutantenkonstruktion.** Die verschiedenen Varianten von *cph1*<sup>-</sup> und *cph2*<sup>-</sup> wurden für die Analyse des Wachstumsverhaltens sowie für die Untersuchung der lichtinduzierten Motilität verwendet. Bei der  $\Delta cph2$ -Mutante wurde das *cph2*-Gen vollständig entfernt. Dieser Mutantentyp wurde nur für Phototaxisexperimente genutzt.

### 3.2 Analyse der lichtabhängigen *cph1*- und *cph2*-Transkription

Zu Beginn der Arbeit lagen wenige Erkenntnisse über die Photoregulation der *cph1*- und *cph2*-Transkriptakkumulation vor. Daher wurde die Menge an *cph1*-mRNA und *cph2*-mRNA unter verschiedenen Lichtbedingungen im WT bzw. in den beiden Phytochrommutanten *cph1*<sup>-</sup> und *cph2*<sup>-</sup> analysiert. Hierfür wurden zunächst Kulturen vom WT und den Mutanten im ML angezogen und anschließend die Zellen für 1 h ins HL, Dunkel, BL, GL, RL und FRL gestellt. Die Lichtbedingungen für die Transkriptionsstudien entsprachen denen der Wachstumsanalysen.

Die Akkumulation des *cph1*-Transkripts wies nach einer einstündigen Inkubation unter verschiedenen Lichtbedingungen eine Zu- bzw. Abnahme unterschiedlichen Ausmaßes gegenüber der Akkumulation im ML auf (Abb. 9A). Der stärkste Anstieg des *cph1*-Transkriptniveaus (650 % des ML-Wertes) wurde unter FRL-Bedingungen beobachtet. Ebenso war die Menge an *cph1*-mRNA nach der Belichtung mit GL (350 % des ML-Wertes) sowie nach 1 h unter völligem Lichtausschluss (280 %) erhöht. Dahingegen war unter HL-Bedingungen die Transkriptakkumulation auf 15 % des ML-Wertes reduziert. Keine Änderung im *cph1*-Transkriptniveau wurde für RL ermittelt. Aufgrund der hohen Standardabweichung verbunden mit einer relativ geringen Zunahme der *cph1*-mRNA-Menge gegenüber dem ML-Wert kann nicht von einem eindeutigen Einfluss von BL auf die Transkriptakkumulation von *cph1* gesprochen werden.



**Abb. 9: Lichtabhängige Änderung der *cph1*-mRNA-Akkumulation im WT und der *cph2*-Mutante (A) sowie lichtabhängige Änderung der *cph2*-mRNA-Akkumulation im WT (B).** Die Änderung des Transkriptniveaus ist in Prozent des ML-Wertes dargestellt. Die Zellen aus einer Kultur, die unter ML-Bedingungen ( $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen wurde, wurden für 1 h mit HL ( $165 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), BL ( $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), GL ( $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), RL ( $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und FRL ( $0,3 \text{ W m}^{-2}$ ) belichtet bzw. wurden für 1 h im Dunkeln (D) gehalten. Die Gesamt-RNA wurde isoliert. Nach der Entfernung der DNA erfolgte die cDNA-Synthese. Die Transkriptmenge wurde mittels quantitativer *real-time* RT-PCR bestimmt und auf die 16S-RNA-Menge normiert, wobei jeweils der Mittelwert von Triplikaten in die Berechnung einbezogen wurde. Die Säulen repräsentieren den Mittelwert, der aus jeweils 1 oder 2 cDNA-Synthesen von 3 unabhängigen Belichtungsreihen kalkuliert wurde. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Im Gegensatz zu *cph1* konnte für *cph2* keine klare Lichtabhängigkeit der Transkriptmenge ermittelt werden (Abb. 9B). *Cph2* wurde unter allen Lichtbedingungen transkribiert. Jedoch wies die *cph2*-Transkriptmenge nach dem Wechsel von ML in ein anderes Licht zwischen den verschiedenen Kulturen ein stark variables Verhalten auf, was in einer großen Streuung der Transkriptdaten resultierte.

Zur Untersuchung einer möglichen Autoregulation der *cph1*- und *cph2*-Transkription wurden Zellen der *cph1*<sup>-</sup>- und *cph2*<sup>-</sup>-Mutante mit den gleichen Lichtbedingungen behandelt wie der WT. Im Ergebnis der *cph1*-mRNA- und *cph2*-mRNA-Analyse wurden ähnlich hohe Mengen dieser Transkripte ermittelt wie für den WT (Daten nicht gezeigt). Die lichtabhängige Änderung der *cph1*-Transkriptakkumulation in der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante entsprach der beim WT beobachteten (Daten nicht gezeigt). Somit konnte kein regulatorischer Einfluss der Phytochrome Cph1 und Cph2 auf die Akkumulation ihrer Transkripte festgestellt werden.

Weiterhin wurde die Photoregulation der *cph1*-Transkriptmenge in der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante sowie die Lichtregulation der *cph2*-Transkriptmenge in der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante untersucht. Während sich die *cph2*-mRNA-Akkumulation in der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante nicht von den Werten des WTs unterschied (Daten nicht gezeigt), bewirkte die *cph2*-Inaktivierung eine gegenüber dem WT veränderte Lichtregulation des *cph1*-Transkriptniveaus (Abb. 9A). In der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante wurde der beim WT beobachtete Anstieg der *cph1*-Transkriptakkumulation im Dunkeln unterdrückt, so dass sich das Transkriptniveau im Dunkeln kaum vom ML-Wert unterschied. Im GL und FRL wurde, wie beim WT, eine Zunahme der *cph1*-mRNA-Akkumulation gegenüber dem ML-Wert gemessen (Abb. 9A). Jedoch war dieser Anstieg bei der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante schwächer als beim WT. Die für die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante ermittelte *cph1*-Transkriptmenge im BL entsprach nahezu dem ML-Wert. Unter dieser Lichtbedingung wurde beim WT ein durchschnittlicher Anstieg des *cph1*-Transkriptniveaus gemessen. Da jedoch die Standardabweichung sehr hoch war, konnte für den WT keine eindeutige Lichtregulation der *cph1*-Transkriptmenge im BL nachgewiesen werden. Daher zeigte die *cph2*-Inaktivierung keine Wirkung auf die *cph1*-Transkriptakkumulation im BL.

Im Gegensatz zu *cph2* wies *cph1* eine Photoregulation seiner Transkriptmenge auf. Weiterhin konnte ein Einfluss des Photorezeptors Cph2 auf die lichtabhängige Änderung

des *cphI*-Transkriptmenge, besonders im Dunkeln, festgestellt werden.

### 3.3 Untersuchung des Wachstumsverhaltens

#### 3.3.1 Einfluss verschiedener Lichtbedingungen auf das Wachstum des WTs und der Phytochrommutanten

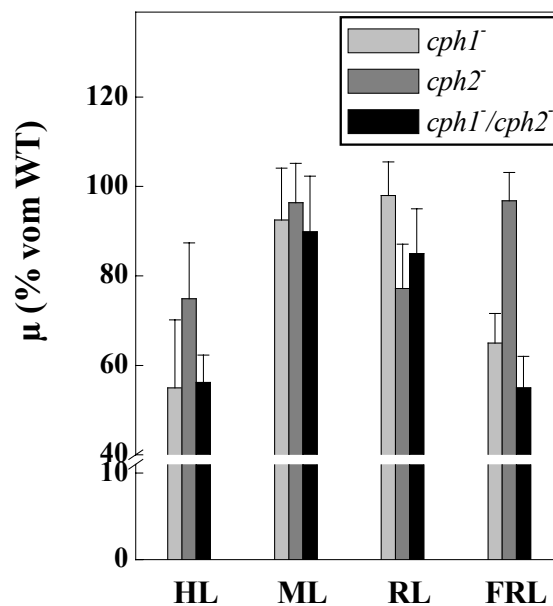
Pflanzliche Phytochrome steuern eine Reihe von photomorphogenetischen Prozessen über die Wahrnehmung des Anteils von RL und FRL in ihrer Umgebung. Im Gegensatz dazu sind die Funktion cyanobakterieller Phytochrome sowie die Anforderungen an das Lichtregime zur Auslösung einer Reaktion dieser Photorezeptoren bisher unbekannt. Daher wurde zunächst das Wachstumsverhalten der Inaktivierungsmutanten von *cphI* und *cph2* unter kontinuierlichem RL und FRL analysiert. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Lichtintensitäten sowie der Spektralfarben grün und blau auf das Wachstum untersucht. Für die Bestimmung der Wachstumsrate ( $\mu$ ) wuchsen der WT und die Phytochrommutanten in zeitgleich angezogenen Kulturen. Dies ließ eine Darstellung von  $\mu$  in Prozent des WT-Wertes zu.

Die *cphI*<sup>-</sup> und die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante zeigten unter RL und FRL ein gegensätzliches Verhalten: Während die *cphI*<sup>-</sup>-Mutante unter FRL im Vergleich zum WT schlechter wuchs, war das Wachstum der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante im RL beeinträchtigt (Abb. 10). Die durchschnittlichen Wachstumsraten von *cphI*<sup>-</sup> im FRL waren auf 65 % und von *cph2*<sup>-</sup> unter RL auf 77 % des WT-Wertes reduziert. Unter Starklichtbedingungen (HL) war das Wachstum sowohl der *cphI*<sup>-</sup>-Mutante (55 % vom WT) als auch der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante (75 % vom WT) gehemmt (Abb. 10). Mit sinkenden Lichtintensitäten nimmt auch die Wachstumsreduktion der Phytochrommutanten ab: Unter mittleren Lichtbedingungen ließ sich nur noch eine geringe Beeinträchtigung des Wachstums beobachten, unter Schwachlicht verschwand diese völlig. Die Einstrahlung von grünem und blauem Licht zeigte keine Wirkung auf das Wachstumsverhalten der Phytochrommutanten.

Um mögliche kompensatorische Effekte zu finden, wurde das Wachstumsverhalten der *cphI/cph2*-Doppelmutante analysiert. Diese verhielt sich jedoch wie die Einzelmutanten: Wie bei *cph2*<sup>-</sup> war das Wachstum unter RL vermindert (84 % vom WT). Eine Reduktion des Wachstums vergleichbar mit der von *cphI*<sup>-</sup> wurde für FRL (55 % vom WT) und HL (56 %

vom WT) ermittelt (Abb. 10).

Insgesamt konnte ein Einfluss des Phytochroms Cph1 auf das Wachstum im FRL und im HL festgestellt werden. Für das Phytochrom Cph2 hingegen konnte eine Wirkung auf das Wachstum im RL und im HL gezeigt werden. Das Wachstumsverhalten der *cph1<sup>-</sup>/cph2<sup>-</sup>*-Doppelmutante deutete nicht auf eine kompensatorische oder überlappende Funktion von Cph1 und Cph2 hin.



**Abb. 10: Wachstumsraten ( $\mu$ ) der Phytochrommutanten in Prozent vom WT unter HL, ML, RL und FRL.** Die Kulturen von WT und Mutante wurden zum gleichen Zeitpunkt gestartet. Dies erlaubt eine prozentuale Angabe der Wachstumsrate. Die Säulen stellen den Mittelwert der relativen Wachstumsrate von *cph1<sup>-</sup>* (hellgrau), *cph2<sup>-</sup>* (grau) und *cph1<sup>-</sup>/cph2<sup>-</sup>* (schwarz) dar ( $n = 4-8$ , für ML  $n = 3$ ). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. In die Kalkulation des Mittelwerts wurden die relativen Wachstumsraten sowohl der Km- als auch der Cm-resistenten *cph1<sup>-</sup>*- und *cph2<sup>-</sup>*-Mutanten einbezogen. Die durchschnittlichen Wachstumsraten des WT betrugen  $0,033 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$  (HL),  $0,030 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$  (ML),  $0,032 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$  (RL) und  $0,0054 \pm 0,0017 \text{ h}^{-1}$  (FRL).

Weiterhin wurde der Einfluss von Glukose auf die Wachstumsreduktion unter HL, RL und FRL untersucht. Die Zugabe von 0,2 % Glukose förderte das Wachstum des WTs im RL und FRL. Unter HL-Bedingungen hingegen war das Wachstum der glukosehaltigen WT-Kulturen gegenüber den glukosefreien reduziert (74 %). Unter dieser Lichtintensität wirkte die Glukose leicht wachstumsstimulierend auf die Phytochrommutanten, so dass sich

im Resultat die Wachstumsraten des WT und der Einzelmutanten nahezu anglichen bzw. sich die Wachstumsreduktion der Doppelmutante gegenüber dem WT verminderte (Tab. 9). Eine Annäherung der Wachstumsraten der Mutanten an den WT-Wert wurde auch für RL und FRL beobachtet werden (Tab. 9). Somit konnte die Zugabe von Glukose die wachstumshemmende Wirkung der Inaktivierung von *cphI* im FRL vollständig und von *cph2* im RL teilweise aufheben.

**Tab. 9: Wachstumsraten ( $\mu$ ) der Phytochrommutanten in Prozent vom WT unter mixotrophen Bedingungen im HL, RL und FRL nach Zugabe von 0,2 % Glukose.** In der Tabelle sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen aufgeführt. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Anzuchtzeihen. Die durchschnittlichen Wachstumsraten des WT betrugen  $0,025\pm0,005\text{ h}^{-1}$  (HL),  $0,054\pm0,010\text{ h}^{-1}$  (RL) und  $0,019\pm0,003\text{ h}^{-1}$  (FRL).

Lichtbedingung	Stamm	$\mu$ (% vom WT)
HL	WT	-
	<i>cphI</i> <sup>-</sup>	97 $\pm$ 9
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	97 $\pm$ 2
	<i>cphI</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	83 $\pm$ 14
RL	WT	-
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	89 $\pm$ 8
	<i>cphI</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	88 $\pm$ 12
FRL	WT	-
	<i>cphI</i> <sup>-</sup>	97 $\pm$ 17
	<i>cphI</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	84 $\pm$ 13

### 3.3.2 Kompetitives Wachstum von WT und Phytochrommutanten

Um die Unterschiede im Wachstumsverhalten von WT und Mutante zu untermauern, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierfür wurden Zellen von WT und Mutante aus der exponentiellen Wachstumsphase von unter FRL, RL, HL und Schwachlicht (LL) gewachsenen Kulturen im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt. Die anschließend verdünnte Mischkultur wuchs über eine von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängigen

Zeitspanne weiter. Unter HL- und RL-Bedingungen, bei denen sich die Zellen mit einer hohen Rate teilen (durchschnittliche Verdopplungszeit  $t_D$  des WT im HL 21 h sowie im RL 23 h), betrug die Inkubationsdauer der Mischkultur 6 bzw. 7 d. Aufgrund der geringen Verwertbarkeit von FRL und LL in der Photosynthese wuchsen die Kulturen unter diesen Lichtbedingungen sehr langsam ( $t_D$  des WT im FRL 128 h sowie im LL 70 h). Daher wurde der Zeitraum des kompetitiven Wachstums unter diesen Lichtbedingungen auf 12 bzw. 13 Tage verlängert. Eine mögliche Verschiebung des Mengenverhältnisses von WT- und Mutantenzellen wurde über ein periodisches Ausplattieren von Zellproben auf antibiotikahaltige sowie -freie Agarplatten und Auszählen der gewachsenen Kolonien erfasst. Für die Konkurrenzexperimente wurden nur Km-resistente Phytochrommutanten eingesetzt, da die Cm-resistenten Mutanten eine geringe Überlebensrate nach dem Wechsel von einer antibiotikafreien Kultur auf eine Cm-haltige Agarplatte aufwiesen.

Während des kompetitiven Wachstums von WT und *cphI*<sup>-</sup> verschob sich der prozentuale Anteil der Mutantenzellen zugunsten des WT sowohl unter HL als auch unter FRL (Abb. 11A und C). Nach 6 Tagen unter HL-Bedingungen sank der prozentuale Anteil von *cphI*<sup>-</sup> in der Mischkultur auf 11 %. Aufgrund der geringen Wachstumsrate im FRL konnte eine stärkere Reduktion von *cphI*<sup>-</sup> (17 %) gegenüber dem WT erst nach 12 Tagen beobachtet werden.

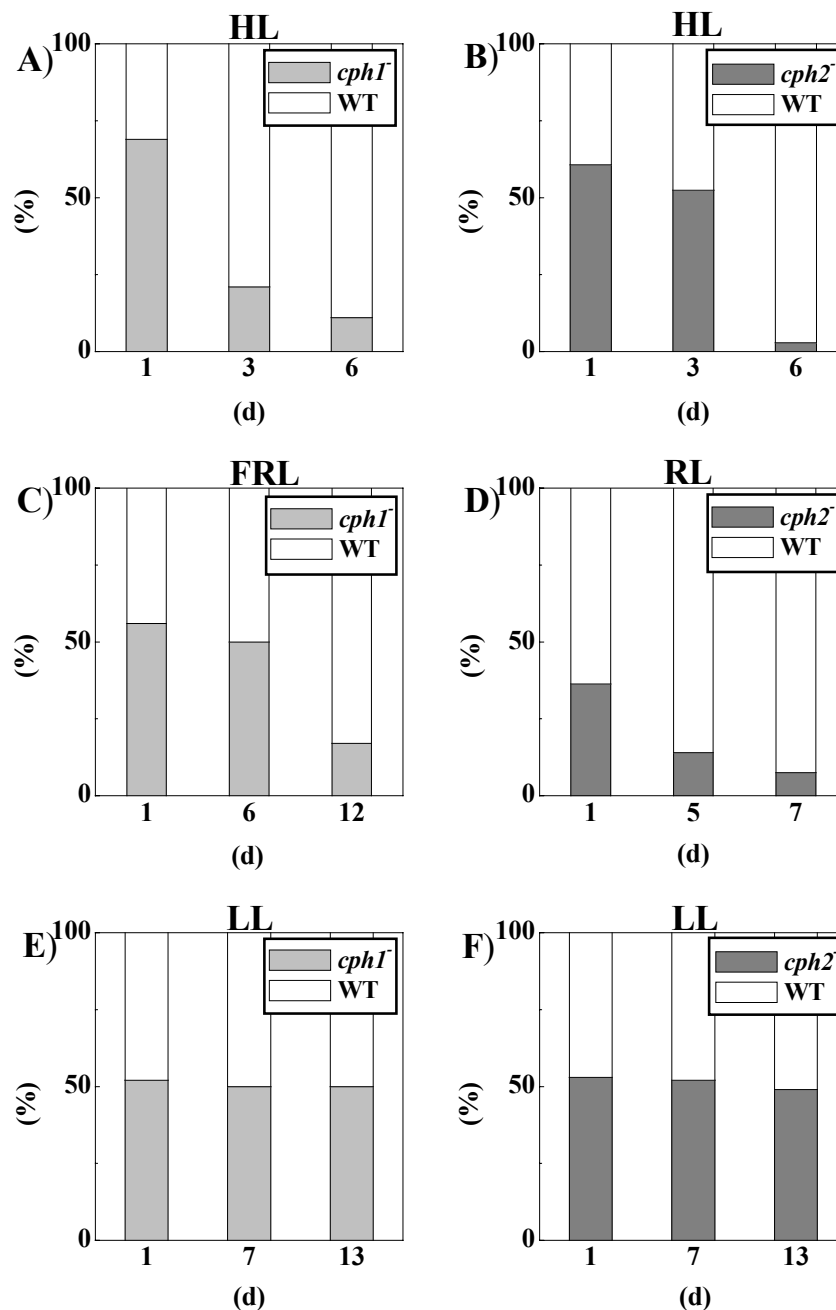
Ein ähnliches Bild zeigte sich beim kompetitiven Wachstum der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante und des WTs unter HL (Abb. 11B). Hier wurde *cph2*<sup>-</sup> am Ende des sechstägigen Wachstums nahezu vollständig durch den WT verdrängt. Auch im RL konnte sich der WT gegenüber *cph2*<sup>-</sup> durchsetzen (Abb. 11D). Nach 7 Tagen enthielt die Mischkultur nur noch 8 % Mutantenzellen.

Die Verschiebung des prozentualen Anteils der Phytochrommutanten zugunsten des WTs könnte auch durch eine abnehmende Überlebensfähigkeit der Mutantenzellen nach dem Wechsel von einer antibiotikafreien Dauerkultur zu einem Km-haltigen Medium hervorgerufen werden. Um dies ausschließen zu können, wurden Konkurrenzexperimente unter LL-Bedingungen ausgeführt, unter denen die Phytochrommutanten in normalen Wachstumskurven keine Wachstumsreduktion gegenüber dem WT aufwiesen. Wie Abb. 11E und F zeigen, blieb unter LL der prozentuale Anteil von WT- und Mutantenzellen jeweils konstant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Konkurrenzexperimente die Resultate aus der Bestimmung der lichtabhängigen Wachstumsraten widerspiegeln: Die *cphI*<sup>-</sup>-Mutante



wies ein vermindertes Wachstum unter HL und FRL auf. Unter diesen Lichtbedingungen nahm auch beim gleichzeitigen Wachstum von *cphI*<sup>-</sup> und WT in einer gemeinsamen Kultur der prozentuale Anteil der Mutante gegenüber dem WT ab. Die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante wuchs unter HL und RL schlechter als der WT. Ebenso dominierte der WT über die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante in einer gemeinsamen Kultur unter diesen Lichtkonditionen.



**Abb. 11: Kompetitives Wachstum von WT und Phytochrommutanten (*cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup>) im HL (A und B), FRL (C), RL (D) und LL (E und F). Die grauen Balken repräsentieren den**

prozentualen Anteil der *cphI*<sup>-</sup> bzw. *cph2*<sup>-</sup>-Zellen an der Gesamtzellzahl. Für die Wettbewerbsstudien wurden Kulturen von WT und Phytochrommutanten eingesetzt, die sich in einer Zwischenkultur an die Lichtbedingungen HL, LL, RL und FRL anpassen konnten. Während des kompetitiven Wachstums von WT und Mutanten wurden über eine von der Wachstumsgeschwindigkeit abhängigen Zeitspanne Proben genommen. Diese wurden auf KM-haltige sowie antibiotikafreie Agarplatten ausplattiert. Die Abbildungen stellen repräsentative Ergebnisse dar.

### 3.3.3 Bestimmung von Photosyntheseparametern

#### 3.3.3.1 Pigmentanalyse

In ihrer natürlichen Umgebung sind Cyanobakterien einem wechselnden Lichtregime ausgesetzt. Cyanobakterien passen sich diesen Bedingungen an, indem sie bei einem Überangebot an Licht ihre lichtsammelnden Antennen zugunsten von protektiv wirkenden Pigmenten reduzieren bzw. bei Lichtmangel ihre Antennen vergrößern. Die beobachteten Wachstumsreduktionen der Phytochrommutanten könnten mit Änderungen in der Pigmentzusammensetzung und dem Pigmentgehalt in einer Wechselbeziehung stehen. Daher wurde eine Pigmentanalyse mittels HPLC sowie Aufnahmen von Absorptionsspektren ganzer Zellen durchgeführt.

Im HL war der Chl-Gehalt der WT-Zellen erwartungsgemäß gegenüber den unter FRL und RL genommenen Proben vermindert (Tab. 10), wobei der höchste Chl-Gehalt unter RL gemessen wurde. Das Verhältnis von Car zu Chl erreichte im HL doppelt so hohe Werte wie im FRL und RL. Das Car/Chl-Ratio unter FRL und RL variierte kaum zwischen den beiden Lichtqualitäten. Unter allen untersuchten Lichtbedingungen zeigte sowohl der Chl-Gehalt als auch das Car/Chl-Verhältnis der *cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup> sowie der Doppelmutante keine signifikanten Abweichungen vom WT (Tab. 10), wobei auch die unter jeweils einer Lichtbedingung gemessenen Anteile der Karotinoide Myx, Zea, Ech und  $\beta$ -Car am Car-Pool ebenfalls nicht zwischen WT und Mutante variierten (Daten nicht gezeigt). Dies trifft ebenso auf das aus Absorptionsspektren ganzer Zellen berechnete PC/Chl-Verhältnis zu. Auch hier waren keine klaren Unterschiede zwischen den Werten von WT und Mutanten zu erkennen.

Der Vergleich der Pigmentdaten von WT und Phytochrommutanten zeigt, dass die Beeinträchtigung des Wachstums nicht durch eine ungenügende Anpassung des Pigmentapparates an die jeweiligen Lichtbedingungen verursacht wurde.

**Tab. 10: Pigmentzusammensetzung von WT und Phytochrommutanten unter den Lichtbedingungen HL, RL und FRL.** Der Chl-Gehalt sowie das Car/Chl-Verhältnis wurde mittels HPLC bestimmt. Das PC/Chl-Verhältnis wurde aus Gesamtzellspektren berechnet (siehe 2.2.5.4.2). In der Tabelle sind Mittelwerte±Standardabweichungen aufgeführt. In die Berechnung wurden die Analysedaten sowohl Km-resistenter als auch Cm-resistenter *cph1*<sup>-</sup>- und *cph2*<sup>-</sup>-Mutanten einbezogen. Die Mittelwerte stammen aus mindestens drei unabhängigen Anzuchtreihen.

Lichtbedingung	Stamm	Chl ( $\mu\text{g OD}_{750\text{nm}}^{-1}$ )	Car/Chl ( $\mu\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ )	PC/Chl
HL	WT	2,31±0,59	0,65±0,14	0,91±0,07
	<i>cph1</i> <sup>-</sup>	2,64±0,38	0,71±0,09	0,84±0,06
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	2,49±0,65	0,66±0,12	0,88±0,06
	<i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	2,72±0,31	0,74±0,09	0,95±0,06
RL	WT	4,22±0,28	0,31±0,04	0,80±0,08
	<i>cph1</i> <sup>-</sup>	4,11±0,42	0,31±0,03	0,81±0,05
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	4,00±0,38	0,30±0,03	0,90±0,08
	<i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	3,91±0,29	0,35±0,03	0,77±0,03
FRL	WT	3,34±0,35	0,32±0,02	0,98±0,11
	<i>cph1</i> <sup>-</sup>	3,16±0,57	0,29±0,03	1,01±0,14
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	3,27±0,23	0,32±0,07	1,07±0,14
	<i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	3,33±0,25	0,34±0,06	0,96±0,16

Für die Daten wurde ein t-Test durchgeführt. Bei allen Werten lag p über 0,05.

### 3.3.3.2 Messung der maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsraten

Der Vergleich der Sauerstofffreisetzungsraten zwischen WT und Phytochrommutanten liefert Hinweise auf mögliche Störungen in der Anpassung der Photosynthesekomponenten an gegebene Lichtbedingungen, wie der photosynthetische Elektronentransport sowie die aktive Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff und dessen Fixierung. Die Abhängigkeit der Sauerstofffreisetzung von der Lichtmenge lässt sich durch eine Sättigungskurve beschreiben: Bis zum Erreichen einer bestimmten Lichtintensität nimmt die Netto-Sauerstofffreisetzungsrates linear zu. Oberhalb dieser Lichtintensität bleibt die Sauerstoff-

freisetzungsrates nahezu konstant. Bei sehr hohen Lichtmengen kann es zur Photoinhibition kommen, wobei die Netto-Freisetzung von Sauerstoff abnimmt.

**Tab. 11: Maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates von WT und Phytochrommutanten.** Die Kulturen wurden unter HL, RL und FRL angezogen. Die Bestimmung der maximalen Sauerstofffreisetzungsrates erfolgte im WL bei 30 °C (siehe 2.2.5.4.4). Der Mittelwert und die Standardabweichung berechnen sich aus den Daten von fünf (HL) bzw. drei (RL, FRL) unabhängigen Anzuchtzeilen. Der Chl-Gehalt wurde mittels HPLC ermittelt.

Lichtbedingung	Stamm	Maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$ )
HL	WT	267±46
	<i>cph1</i> <sup>-</sup>	260±102
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	282±14
	<i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	218±70
RL	WT	149±45
	<i>cph1</i> <sup>-</sup>	146±55
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	146±43
	<i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	155±53
FRL	WT	950±451
	<i>cph1</i> <sup>-</sup>	612±129
	<i>cph2</i> <sup>-</sup>	672±267
	<i>cph1</i> <sup>-</sup> / <i>cph2</i> <sup>-</sup>	600±48

Für die Daten wurde ein t-Test durchgeführt. Bei allen Werten lag p über 0,05.

Die maximale Netto-Sauerstofffreisetzung von unter HL, RL und FRL gewachsenen Kulturen vom WT und den Phytochrommutanten wurde im WL bestimmt. Die während der Messung der Sauerstoffentwicklung eingestrahlte Lichtintensität wurde solange heraufgesetzt bis die Netto-Sauerstofffreisetzung nicht mehr anstieg. Die dabei ermittelten Werte sind in Tab. 11 aufgeführt. Die Chl-bezogene Netto-Sauerstofffreisetzungsrates des WT

zeigte eine klare Abhängigkeit vom Anzuchtlicht. Die im HL angezogenen WT-Kulturen wiesen eine durchschnittliche maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates von  $267 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$  auf (Tab. 11). WT-Kulturen, die unter RL-Bedingungen gewachsen waren, zeigten mit  $149 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$  eine im Vergleich zum HL verringerte maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates. Unter FRL hingegen war diese mit  $950 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$  deutlich erhöht (Tab. 11).

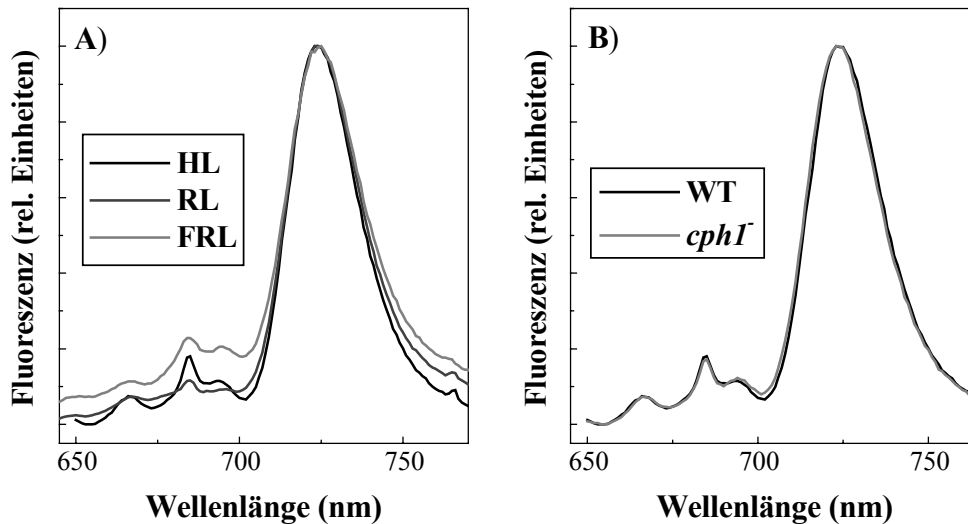
Die maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsrates der zeitgleich mit dem WT angezogenen *cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup> und Doppelmutanten unterschieden sich unter HL und RL nicht von den WT-Werten (Tab. 11). Die maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsrates der mit FRL belichteten Mutantenkulturen lagen mit 600 bis  $672 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$  unterhalb des WT-Werts ( $950 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chl h}^{-1}$ ). Jedoch ist der gefundene Unterschied in der durchschnittlichen maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsrates nicht die Ursache für das beeinträchtigte Wachstum von *cphI*<sup>-</sup> und *cphI/cph2*<sup>-</sup> im FRL: Zum einen lagen die Werte für die maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates von *cph2*<sup>-</sup> in einem ähnlichen Bereich wie die von *cphI*<sup>-</sup> sowie der Doppelmutante (Tab. 11). Die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante zeigte jedoch im Gegensatz zu den beiden letzteren Mutanten keine Wachstumsreduktion im FRL. Zum anderen sind die Unterschiede in der maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsrates zwischen dem WT und den Phytochrommutanten aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter keiner Lichtbedingung wesentliche Abweichungen in der maximalen Sauerstoffentwicklung zwischen WT und Mutanten zu beobachten waren. Somit deuten die Ergebnisse aus der Messung der Sauerstofffreisetzung auf keine deutlichen Modifikationen in der Effizienz oder im Aufbau des Photosyntheseapparats in seiner Gesamtheit hin.

### 3.3.3.3 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren

Das beobachtete reduzierte Wachstum der Phytochrommutanten könnte durch eine unzureichende Anpassung von Komponenten des Photosyntheseapparats hervorgerufen worden sein. Die Aufnahme von 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren bei Anregung von Chl *a* visualisiert bei Cyanobakterien unter bestimmten Bedingungen die Stoichiometrie von Photosystem II (PSII) und Photosystem I (PSI). Zur Auffindung möglicher Unterschiede zwischen WT und Phytochrommutanten wurden 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren von

in Glycerol eingefrorenen Zellen aufgenommen, bei denen Chl *a* (bei 440 nm) angeregt wurde.



**Abb. 12:** Vergleichende Darstellung der 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren ganzer Zellen von WT im HL, RL und FRL (A) sowie von WT und *cphI*<sup>-</sup> unter HL (B). Die Zellsuspensionen wurden auf ca. 5 µg Chl eingestellt und nach 10 min Dunkeladaption in 70 % Glycerol eingefroren. Das Chl wurde mit einer Wellenlänge von 440 nm angeregt. Die Spektren wurden auf ihr Maximum (bei 725 nm) normiert.

Cyanobakterien weisen zwischen den Arten eine vergleichsweise hohe Variabilität in der Zusammensetzung der lichtsammelnden Antennen sowie in der PSII/PSI-Stoichiometrie auf, welches die Fluoreszenzemission beeinflusst (Campbell *et al.*, 1998). Die exakte Position und das relative Maximum der Fluoreszenzemission von PSI und PSII ist daher bei Cyanobakterien von der Spezies abhängig. In *Synechocystis* besitzt das Allophycocyanin im Bereich zwischen 670 und 675 nm ein Maximum. Bei 685 nm emittieren der terminale Emmitter der Phycobilisomen und das CP43 (PSII) sowie bei 695 nm das CP47 (PSII) und das Reaktionszentrum des PSII. Die intensivste Emission (bei ca. 725 nm) geht von mit PSI assoziiertem Chl *a* aus (Mao *et al.*, 2003). Wie am Beispiel des WTs in Abb. 12A dargestellt, änderte sich die relative Intensität der Fluoreszenzemission von PSII in Relation zu PSI in Abhängigkeit von den Lichtbedingungen während der Anzucht: Im HL und FRL war die relative Fluoreszenzemission des PSII im Vergleich zum RL erhöht. Die 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren von *cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup> und Doppelmutante unter HL, RL und

FRL wiesen keine signifikanten Änderungen gegenüber den entsprechenden Spektren des WT auf, wie für *cphI*<sup>-</sup> und WT unter HL in Abb. 12B gezeigt wird. Daher kann eine Änderung in der Struktur der Photosysteme als Ursache für die Beeinträchtigung des Wachstums der Phytochrommutanten ausgeschlossen werden.

### 3.4 Untersuchung der lichtinduzierten Motilität

*Synechocystis* besitzt die Fähigkeit zu einer lichtgerichteten aktiven Ortsänderung. Bisherige Untersuchungen deuten auf eine Funktion von Photorezeptoren bei der Lichtregulation dieser Bewegung hin (Choi *et al.*, 1999). Zu Beginn dieser Arbeit war noch kein Photosensor mit einer entsprechenden Funktion bekannt. Daher wurde der Einfluss der Phytochrome Cph1 und Cph2 auf die lichtinduzierte Motilität analysiert.

#### 3.4.1 Motilität unter verschiedenen Lichtbedingungen

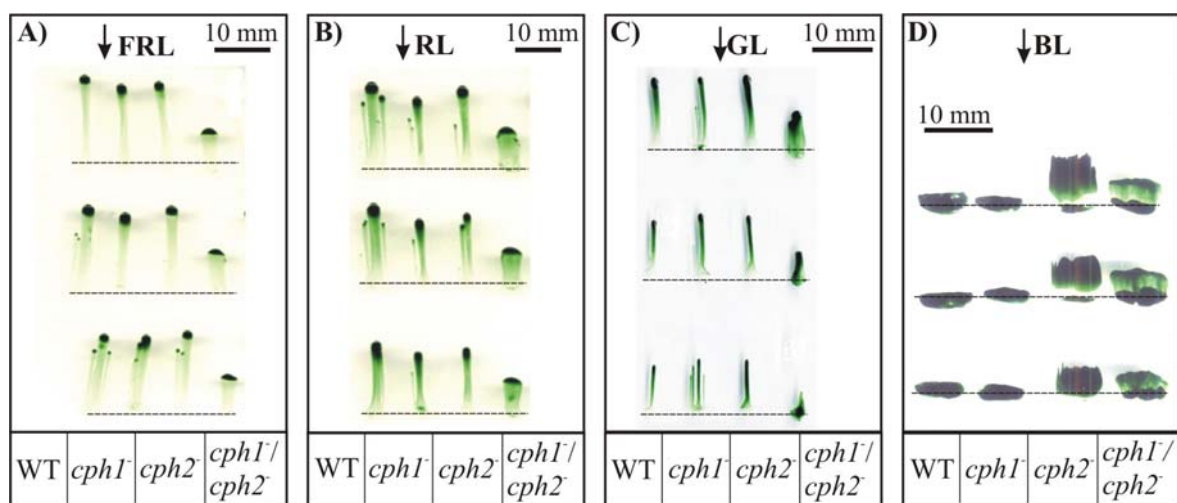
##### 3.4.1.1 Der Einfluss der Spektralfarbe auf die Motilität

Für die Untersuchung der lichtinduzierten Motilität wurden Zellen von WT, *cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup> und der Doppelmutante auf glukosehaltige Agarplatten aufgetragen. Anschließend wurden diese Agarplatten in einen Lichtgradienten von FRL, RL, GL und BL gestellt. Diese Lichtfarben wurden mittels Plastikfiltern (Lee) erzeugt.

Nach einer zweiwöchigen Belichtung mit FRL, RL und GL zeigte der WT eine deutliche Bewegung in Richtung der Lichtquelle (Abb. 13A-C). Ebenso verhielten sich *cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup> sowie die Doppelmutante, so dass man unter diesen Bedingungen nicht von einem Einfluss der beiden cyanobakteriellen Phytochrome auf die Steuerung der Motilität sprechen kann. Ein anderes Bild ergab sich bei der Untersuchung der BL-vermittelten Zellbewegung (Abb. 13D). WT und *cphI*<sup>-</sup> verharrten auf ihrer Ausgangsposition, während die Zellen von *cph2*<sup>-</sup> und *cphI*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> zur BL-Quelle wanderten. Die BL-vermittelte Motilität wurde auch mit Hilfe weiterer BL-Quellen untersucht, die Licht in einem stärker eingegrenzten Wellenlängenbereich aussenden. Die Einstrahlung von Licht, das durch Kombination eines blauen dichroischen Filters sowie eines UV-cut-off-Filters erzeugt wurde, erbrachte das gleiche Resultat wie die Verwendung der blauen Plastikfilter. Auch hier bewegten sich nur *cph2*<sup>-</sup> und *cphI*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> in Richtung BL, während der WT und die *cphI*<sup>-</sup>-Mutante nicht motil

waren (Daten nicht gezeigt). Das gleiche gilt auch für die Verwendung von BL-Photodioden (Daten nicht gezeigt).

Im FRL, RL und GL bewegte sich *cph1<sup>-</sup>/cph2<sup>-</sup>* langsamer als der WT, *cph1<sup>-</sup>* und *cph2<sup>-</sup>*. Auch unter BL war die Geschwindigkeit der *cph1<sup>-</sup>/cph2<sup>-</sup>*-Zellen vermindert. Dieser Effekt konnte auch bei Phototaxisuntersuchungen von Doppelmutanten anderer Photorezeptoren beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die herabgesetzte Laufgeschwindigkeit von dem gleichzeitigen Vorhandensein zweier Antibiotikaresistenzgen-Kassetten verursacht wurde.



**Abb. 13: Motilität von WT, *cph1<sup>-</sup>*, *cph2<sup>-</sup>* und der Doppelmutante unter FRL (A), RL (B), GL (C), BL (D).** Die Richtung des eingestrahlichten Lichtes ist durch einen Pfeil markiert. Die Zellen wurden in drei verschiedenen Entfernungen von der Lichtquelle aufgetragen (gekennzeichnet durch eine gestrichelte Linie), wobei die zweite und dritte Position eine Reduktion der Lichtintensität auf ca. 60 % und 35 % gegenüber der lichtzugewandten ersten Position aufwies. Die Lichtintensitäten an den ersten Positionen betrugen 0,2 W m<sup>-2</sup> (FRL), 0,3 W m<sup>-2</sup> (RL), 0,6 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (GL) und 1,3 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (BL). Die Zellen wurden nach Auftragung auf die Agarplatte für 14 Tage mit den oben genannten Lichtfarben belichtet.

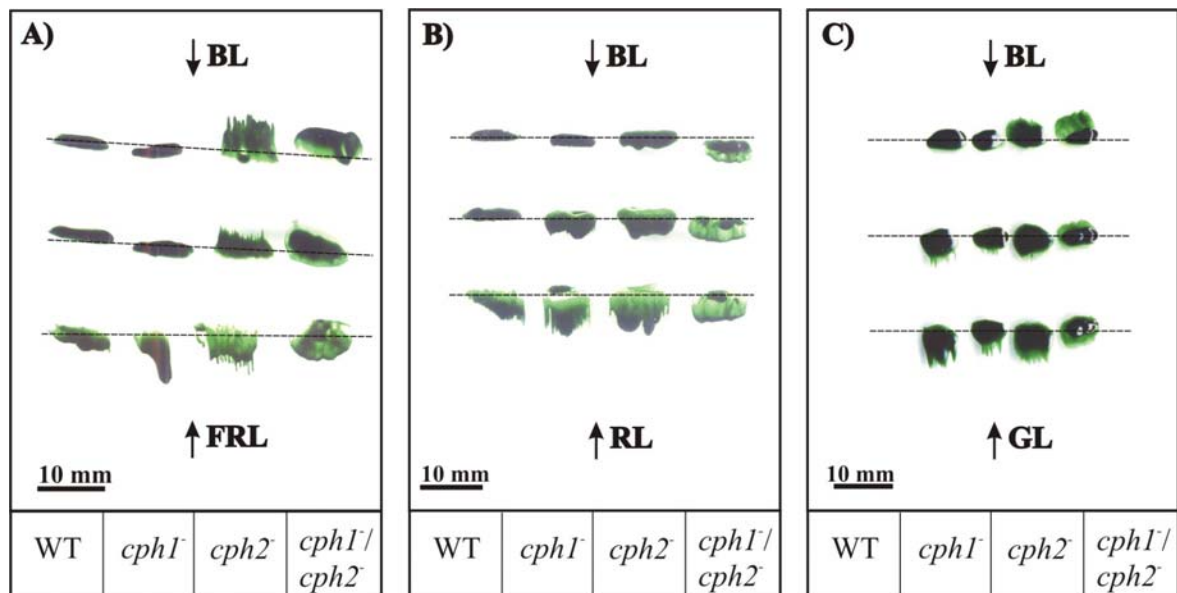
Bei der in Abb. 13C dargestellten Phototaxisplatte legten die Zellen von WT und Phytochrommutanten, welche auf die am weitesten von der Lichtquelle entfernten Position aufgetragen wurden, eine kürzere Distanz zurück als die Zellen auf der lichtzugewandten ersten Position. Dieses Resultat lässt sich mit Photokinese erklären, d. h. die Laufgeschwindigkeit der Zellen ist von der Lichtintensität abhängig. Auch in Abb. 13D sind photokinetische Reaktionen erkennbar.



Insgesamt konnte keine Funktion des Phytochroms Cph1 in der Steuerung der lichtinduzierten Motilität festgestellt werden. Die Analyse der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante deutet auf eine Funktion des Lichtsenors Cph2 in der Inhibierung der Motilität des WTs im BL hin.

### 3.4.1.2 Das phototaktische Verhalten unter bidirektionaler Einstrahlung von Licht

In diesem Kapitel wird der Einfluss einer zusätzlich eingestrahnten Lichtfarbe auf die BL-gesteuerte Motilität beschrieben. Hierfür wurde im 180°-Winkel von der BL-Quelle eine weitere Lichtquelle mit FRL, RL oder GL angeordnet. Die Zellen von WT und Phytochrommutanten wurden relativ zu den beiden Lichtquellen auf verschiedene Positionen aufgetragen.



**Abb. 14: Bidirektionale Einstrahlung von BL kombiniert mit FRL (A), RL (B) und GL (C) im 180°-Winkel.** Die Richtung des einfallenden Lichts ist durch Pfeile markiert. Die Lichtfarben wurden durch Verwendung von Plastikfiltern erzeugt. Die Zellen wurden auf verschiedene Positionen innerhalb des Lichtfeldes aufgetragen (gekennzeichnet durch eine gestrichelte Linie), so dass sich variierende Anteile der jeweiligen Lichtfarben ergab.

Bei der Einstrahlung einer weiteren Lichtfarbe (FRL, RL, GL) zusätzlich zum BL erhielt der WT seine Fähigkeit zur Motilität zurück, wobei die Zellen sich jedoch zur FRL-, RL- bzw. GL-Quelle bewegten (Abb. 14A-C). Ebenso verhielt sich die gleichfalls im BL immobile *cph1*<sup>-</sup>-Mutante. Im Fall der BL-FRL-Belichtung beeinflusste die Entfernung zur jeweiligen Lichtquelle die Laufrichtung der *cph2*<sup>-</sup> sowie der Doppelmutante (Abb. 14A).

Bei der bidirektionalen Einstrahlung von BL und RL (Abb. 14B) bewegten sich *cph2*<sup>-</sup> und *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> bevorzugt in Richtung RL: Auch an der Position, die dem BL am nächsten war, wiesen die Zellen dieser Mutanten eine schwache Bewegung zum RL auf. Hingegen zeigten der auf der gleichen Position innerhalb des BL-RL-Gradienten befindliche WT sowie die *cph1*<sup>-</sup>-Mutante keine Motilität. An der Position mit erhöhtem RL-Anteil liefen sowohl der WT als auch die Phytochrommutanten in Richtung RL.

Die bidirektionale Belichtung mit GL und BL (Abb. 14C) lieferte ein ähnliches Bild wie die BL-FRL-Belichtung: Auch hier wanderten die Zellen von *cph2*<sup>-</sup> und *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> zur der Lichtquelle mit der geringsten Entfernung, während sich nur die näher zum GL befindlichen Zellen von WT und *cph1*<sup>-</sup> in Richtung GL bewegten.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Hemmung der Motilität von WT und *cph1*<sup>-</sup> im BL durch die Einstrahlung von FRL, RL oder GL aufheben ließ. Hierbei konnte nur dann Motilität beim WT und der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante induziert werden, wenn der Anteil von FRL, RL bzw. GL gegenüber BL hoch genug war.

#### 3.4.1.3 Aktionsspektrum der Motilität im blauen Wellenlängenbereich

Phytochrome absorbieren sowohl rotes als auch blaues Licht, wobei das Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich gegenüber dem im kurzwelligen Bereich verstärkt ist (Abb. 1 zeigt ein typisches Absorptionsspektrum eines Phytochroms.). Cph2 besitzt zwei chromophorbindende GAF-Domänen. Während das PCB-Addukt der N-terminalen GAF-Domäne eines rekombinanten Cph2-Proteins in seinen Absorptionseigenschaften einem typischen Phytochrom ähnelt, zeigt das PCB-Addukt der C-terminalen Domäne keine Photochromozität jedoch eine gegenüber dem RL verstärkte Absorption von BL (Wu und Lagarias, 2000). Die bisherigen Daten lassen nicht erkennen, ob Cph2 als BL-Rezeptor die Motilität im BL inhibiert oder ob dieser Photorezeptor mit einem BL-Sensor interagiert. Die Aufnahme eines Aktionsspektrums der BL-gesteuerten Motilität des WTs sollte Aufschluss über eine mögliche Vergleichbarkeit des Aktionsspektrums mit dem Absorptionsspektrum der C-terminalen GAF-Domäne von Cph2 oder dem eines typischen BL-Rezeptors geben.

Das Aktionsspektrum wurde mit Hilfe von Interferenzfiltern aufgenommen, die Licht in

einem relativ schmalen Wellenlängenbereich transmittieren. Wurde ein Interferenzfilter mit einem Transmissionsmaximum bei 474 nm und höher eingesetzt, konnte eine Bewegung der WT-Zellen in Richtung der Lichtquelle beobachtet werden (Tab. 12). Wurden hingegen die Zellen mittels eines Interferenzfilters mit 461 nm und geringer belichtet, zeigte der WT keine Motilität. Als Kontrolle diente die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante. Diese zeigte unter den meisten Lichtbedingungen eine positive Phototaxis (Tab. 12). Jedoch bewirkte die Einstrahlung von UV(A)-Licht (Maximum bei 370 nm) eine negative Phototaxis der Mutante. Bei Experimenten mit Interferenzfiltern mit einem Transmissionsmaximum bei 405 nm wurden variierende Resultate erzielt. So wurde sowohl positive als auch negative Phototaxis der *cph2*<sup>-</sup>-Zellen beobachtet.

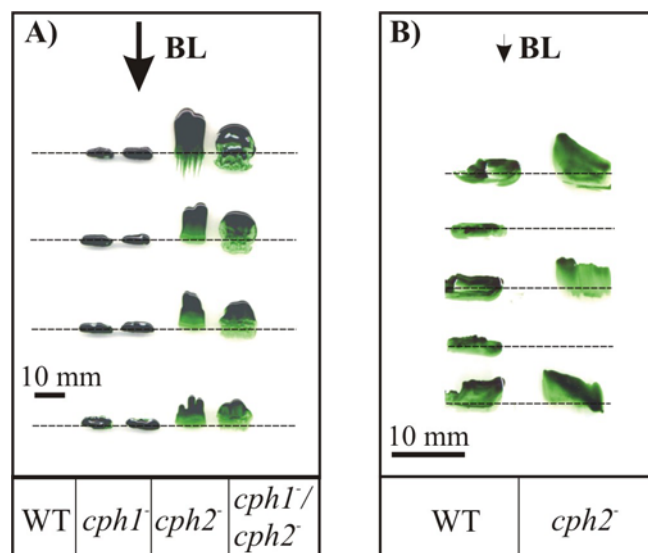
**Tab. 12: Aktionsspektrum der lichtinduzierten Motilität des WTs in einem Wellenlängenbereich zwischen 370 bis 500 nm.** Für die Aufnahme des Aktionsspektrums wurden Interferenzfilter kombiniert mit verschiedenen Lichtquellen eingesetzt. Die Lichtintensität betrug in Abhängigkeit vom Filter 1 bis 3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Wellenlänge des Transmissionsmaximums (nm)	WT	<i>cph2</i> <sup>-</sup>
370	keine Motilität	negativ
405	keine Motilität	negativ/positiv
436	keine Motilität	positiv
446	keine Motilität	positiv
451	keine Motilität	positiv
461	keine Motilität	positiv
474	positiv	positiv
480	positiv	positiv
490	positiv	positiv
504	positiv	positiv

Zur Untersuchung der BL-gesteuerten Motilität wurden die Zellen von WT und Phytochrommutanten mit Licht geringer Intensität (bis zu 3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) belichtet. Daher ist es

nicht auszuschließen, dass sich WT und *cphI*<sup>-</sup> unter dem Einfluss von BL mit einer höheren Lichtintensität wie *cph2*<sup>-</sup> verhalten und in Richtung Lichtquelle wandern.

Zu diesem Zweck wurde die Intensität des eingesetzten BLs verstärkt und das phototaktische Verhalten des WT und der Phytochrommutanten unter diesen Bedingungen analysiert. Leider konnte nur eine BL-Intensität von maximal 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erzielt werden. Bei einer Einstrahlung von 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  BL waren weder WT noch *cphI*<sup>-</sup> zu einer lichtgerichteten Bewegung befähigt (Abb. 15A). Die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante und die Doppelmutante hingegen bewegten sich in Richtung BL. Die Abb. 15A läßt Photokinese bei der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante und der *cphI*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante erkennen: Die auf den Positionen näher an der Lichtquelle befindlichen Zellen bewegten sich schneller als die auf den weiter vom Licht entfernten Positionen. Ein Teil der Zellen von *cph2*<sup>-</sup> und der Doppelmutante, die auf die Position dicht an der Lichtquelle aufgetragen wurden, zeigten negative Phototaxis.



**Abb. 15: Motilität von WT, *cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup> und der Doppelmutante unter Einfluss erhöhter (A) und geringer (B) BL-Intensität.** Für das Phototaxisexperiment wurden Plastikfilter eingesetzt. Die Plastikfilter haben die Eigenschaft, im dunkelroten Wellenlängenbereich zu einem geringen Anteil Licht durchzulassen. Die Lichtstärke wurde von ca. 1,3  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  auf 35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  erhöht bzw. auf 0,1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  herabgesetzt.

Ein völlig anderes Bild ergab sich, wenn die Intensität des eingestrahnten BL stark reduziert wurde. Sank die Lichtintensität auf Werte unter ca. 0,1  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  war der WT zu einer positiven Phototaxis befähigt (Abb. 15B). Eine mögliche Ursache für diesen Effekt könnte in den Eigenschaften der Plastikfilter zu finden sein, die hauptsächlich für die Untersuchung der BL-gesteuerten Motilität verwendet wurden. Diese öffnen bei einer Wellen-

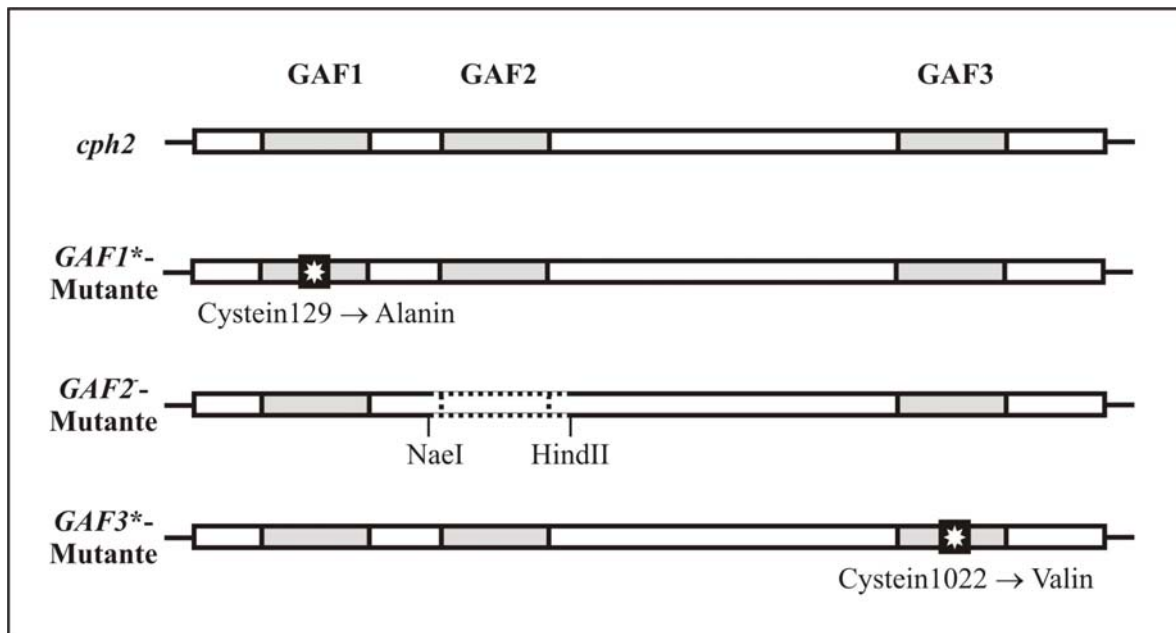
länge von ca. 680 nm und lassen so FRL zu einem geringen Anteil durch. Wurden für die Untersuchung der Motilität im BL Filter oder Photodioden eingesetzt, die nur reines BL transmittieren bzw. emittieren, konnte der oben beschriebene Effekt nicht beobachtet werden: Auch bei einer sehr geringen BL-Intensität bewegte sich der WT nie in Richtung Licht (Daten nicht gezeigt).

#### 3.4.1.4 Komplementationsanalyse: Austausch der chromophorbindenden Cysteine von Cph2 durch ortsgerichtete Mutagenese

Wie bereits erwähnt, besitzt Cph2 sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus eine chromophorbindende GAF-Domäne. Trotz differenter spektraler Eigenschaften vermögen beide gebundenen Chromophore in unterschiedlichem Ausmaß blaues Licht zu absorbieren. Folgender Abschnitt soll die Frage klären, ob die BL-Perzeption einer der beiden Domänen zugeordnet werden kann. Zu diesem Zweck wurden Mutanten von *cph2* konstruiert, bei denen jeweils eines der chromophorbindenden Cysteine über ortsgerichtete Mutagenese des entsprechenden Triplets durch eine andere Aminosäure ersetzt wurde. Im Fall des Cystein129 in der N-terminalen GAF-Domäne geschah dies durch ein Alanin (GAF1\*), im Fall des Cystein1022 in der C-terminalen GAF-Domäne durch ein Valin (GAF3\*) (Abb. 16). Die Fähigkeit der mittleren GAF-Domäne zur Bindung eines Chromophor ist nicht bekannt. Das konservierte Cystein ist in dieser Domäne ist nicht vorhanden. Die Funktion dieser Domäne ist bisher unklar. Möglicherweise dient diese Domäne der Protein-Protein-Interaktion oder der Anheftung weiterer Liganden. Die GAF2-Domäne wurde ausgeschaltet, indem diese *in frame* zwischen den Restriktionsorten NaeI (577) und HindII (1342) deletiert wurde (GAF2<sup>-</sup>). Dadurch wurde das Protein um insgesamt 255 AS verkürzt.

Die beschriebenen Mutationen wurden zunächst in einem bereits existenten *cph2*-pQE12-Konstrukt erzeugt. Bei diesem befindet sich das *cph2*-Gen unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors und besitzt an seinem C-terminalen Ende einen His-tag. Mittels der Restriktionsendonukleasen XhoI und PvuII wurde *cph2* aus dem pQE12-Vektor ausgeschnitten und zwischen die Schnittstellen von XhoI und SmaI in der Km-Kassette des pVZ321-Vektor inseriert (Abb. 17A), einem sich in *Synechocystis* autonom replizierenden Plasmids (Zinchenko *et al.*, 1999). Das resultierende Konstrukt wurde anschließend durch Konjugation in die Km-resistente  $\Delta cph2$ -Mutante (Abb. 8) eingeschleust. Das Vorhandensein der verschiedenen *cph2*-pVZ321-Konstrukte wurde nach Isolation dieser Plasmide aus

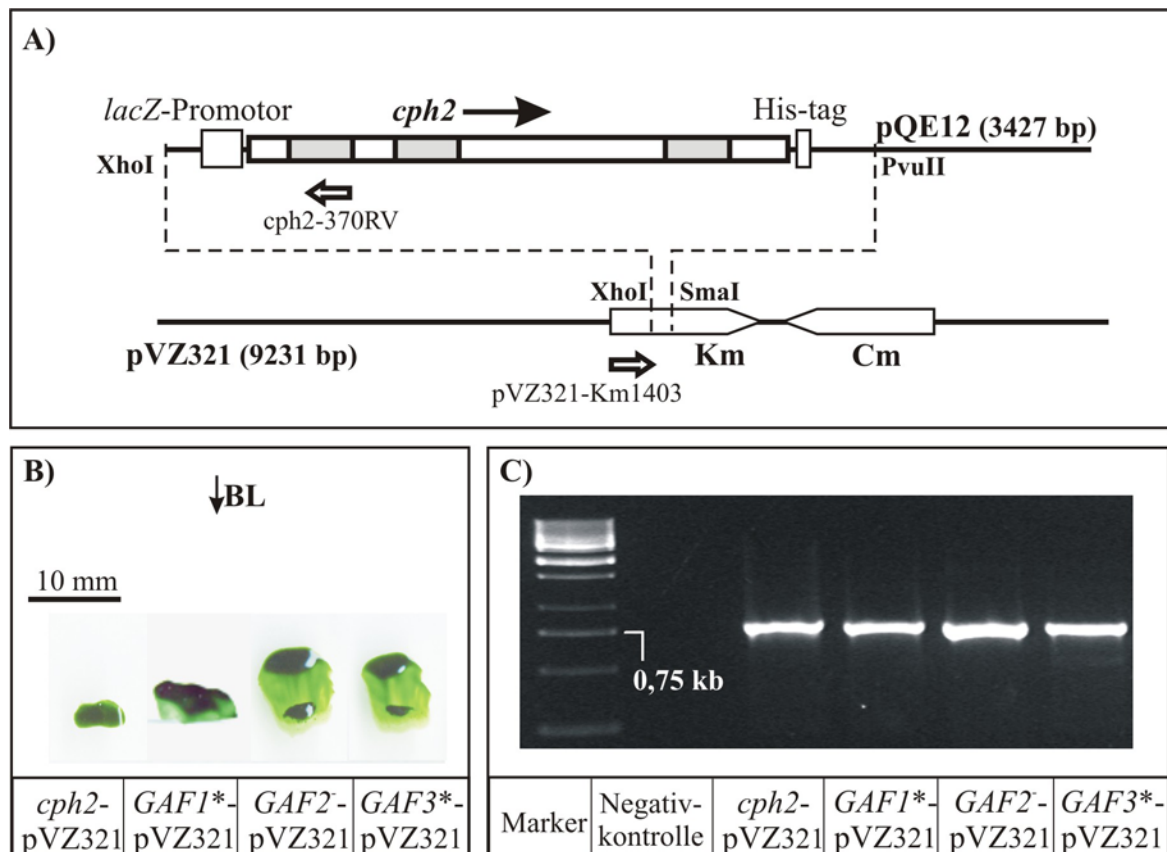
den Transkonjuganten mittels PCR nachgewiesen (Abb. 17C).



**Abb. 16:** Schematische Darstellung von *cph2*-Mutanten, bei denen je eine der beiden chromophorbindenden Cysteine mittels ortsgerechter Mutagenese durch ein Alanin bzw. Valin ausgetauscht wurde bzw. die GAF-Domäne vollständig entfernt wurde.

Die Untersuchung der BL- und der WL-abhängigen Motilität der Transkonjuganten zeigte, dass die Komplementation des *cph2-knockouts* mit *cph2*-pVZ321 das WT-Verhalten im BL wiederherstellen konnte (Abb. 17B). Dahingegen behielten *GAF3\** und *GAF2\** die Fähigkeit, zu einer BL-Quelle zu laufen. Die verschiedenen Klone von *GAF1\** verhielten sich mehrheitlich wie die *cph2*-Mutante, d.h. sie waren unter BL-Bedingungen motil.

Leider war der beobachtete Phänotyp der *cph2*-pVZ321-Variante nicht stabil. Meist zeigten nur wenige Wochen alte Transkonjuganten WT-Verhalten. Nach einiger Zeit setzte sich der Mutantenphänotyp durch, obwohl sich das *cph2*-pVZ321-Plasmid in den Zellen noch nachweisen ließ.

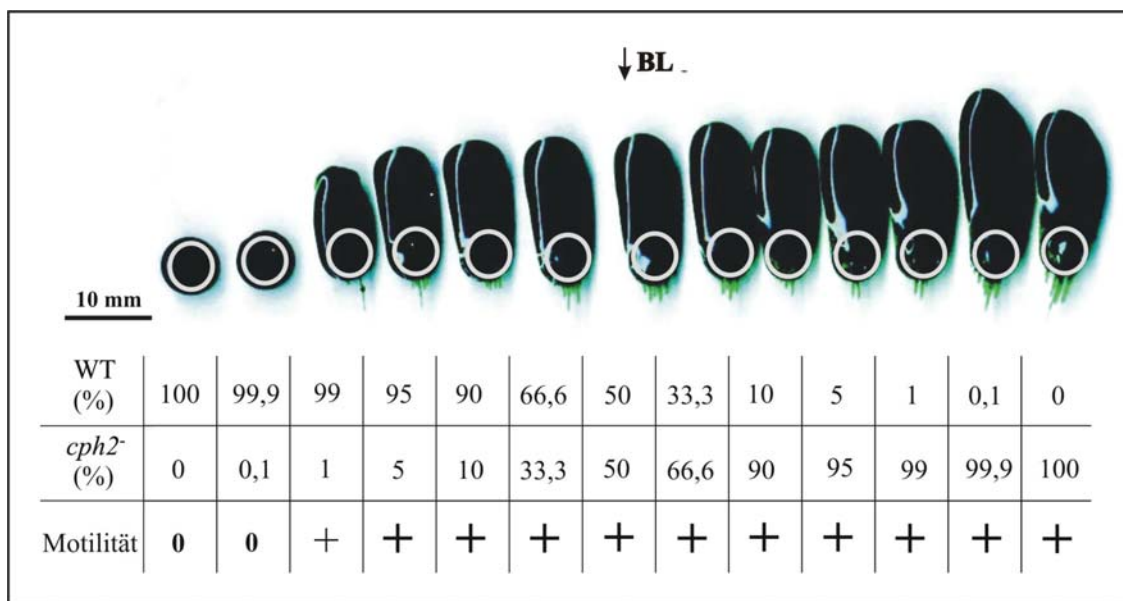


**Abb. 17:** Komplementation der *cph2*-Deletion mit einem *cph2*-Gen, bei dem entweder eines der chromophorbindernden Cysteine durch ein Alanin (*GAF1*\*) oder ein Valin (*GAF3*\*) ausgetauscht wurde bzw. die mittlere GAF-Domäne ohne nachgewiesene Bilin-Bindfähigkeit vollständig entfernt wurde (*GAF2*). Als Kontrolle diente ein *cph2*-pVZ321-Konstrukt, dessen GAF-Domänen nicht verändert wurden. Die Position der *cph2*-Insertion in den pVZ321-Vektor ist in (A) dargestellt. Das Laufverhalten der Transkonjuganten unter BL ist in (B) abgebildet. (C) zeigt den Nachweis der aus *Synechocystis* isolierten Plasmide durch eine PCR unter Verwendung der Primer pVZ321-Km1403 und *cph2*-370RV, die an die Km-Kassette im pVZ321 bzw. an das inserierte *cph2*-Gen binden.

#### 3.4.1.5 Motilität von WT und *cph2*<sup>-</sup> in einer Mischkultur

Dieses Kapitel beschreibt die Auswirkung einer Mischkultur von WT und *cph2*<sup>-</sup>-Mutante auf die BL-gesteuerte Motilität. Dazu wurden Mischkolonien mit variierenden Anteilen von 0,1 % bis 99,9 % *cph2*<sup>-</sup> an der Mischkultur hergestellt und deren Motilität im BL untersucht. Dabei reichte eine sehr geringe Menge an *cph2*<sup>-</sup>-Zellen aus, um Motilität der Mischkolonien zum BL zu induzieren (Abb. 18).

Somit könnte der im vorherigen Kap. 3.4.1.4 beschriebene instabile Phänotyp der *cph2*-pVZ321-Transkonjuganten auf eine zunehmende Anzahl von Zellen in der *cph2*-pVZ321-Transkonjuganten-Kultur zurückzuführen sein, die das *cph2*-pVZ321-Plasmid wieder verloren haben.

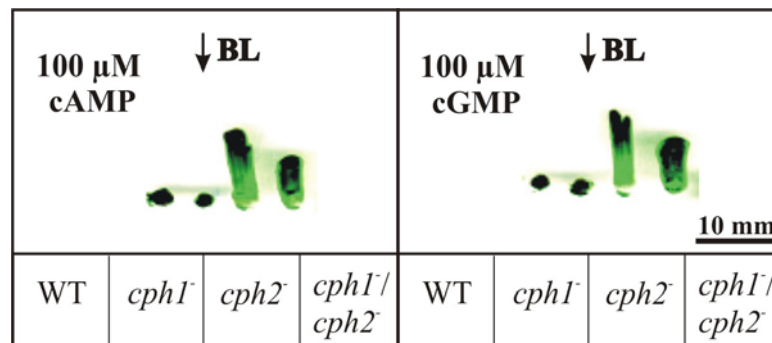


**Abb. 18: Motilität von Mischkolonien mit sich graduell änderndem Anteil von WT- und *cph2*-Zellen.** Eine separat angezogene Kultur von WT und Mutante wurde auf eine gleiche OD eingestellt. WT und *cph2*<sup>-</sup> wurden in variierendem Mengenanteil zueinander (siehe Tabelle in der Abbildung) gemischt. Anschließend wurden 3 µl des abzentrifugierten Zellpellets auf eine Agarplatte aufgetropft. Der ursprüngliche Auftragungsort ist durch einen Kreis gekennzeichnet. Als Kontrolle dienten eine reine WT- sowie *cph2*<sup>-</sup>-Kultur. 0: keine Motilität; +: Motilität, wobei die Stärke des Symbols das Ausmaß der Motilität im Vergleich zur reinen *cph2*<sup>-</sup>-Kolonie beschreibt. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Ergebnis dar.

#### 3.4.1.6 Einfluss der externen Zugabe von cAMP und cGMP sowie der Photosyntheseinhibitoren DCMU und DBMIB auf die BL-gesteuerte Motilität

In den letzten Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen einen Zusammenhang zwischen Motilität und cAMP bzw. Adenylat-Zyklasen sowohl bei *Synechocystis* (Terauchi und Ohmori, 1999; Yoshimura *et al.*, 2002a; Yoshimura *et al.*, 2002b) als auch bei anderen Mikroorganismen wie *Euglena gracilis* (Ntefidou *et al.*, 2003) herstellen. Aufgrund dieser möglichen Verbindung zwischen Cph2 und dem Einfluss zyklischer Nukleotide auf die Steuerung der Motilität wurde den Phototaxisplatten 100 µM cAMP bzw. cGMP zugesetzt und das Verhalten von WT und Phytochrommutanten unter BL beobachtet. Wie in Abb. 19 ersichtlich, veränderte die Zugabe von cAMP bzw. cGMP nicht das Laufverhalten unter BL: Der WT zeigte weder eine Bewegung entlang des BL-Gradienten, noch wurde die Motilität von *cph2*<sup>-</sup> inhibiert.

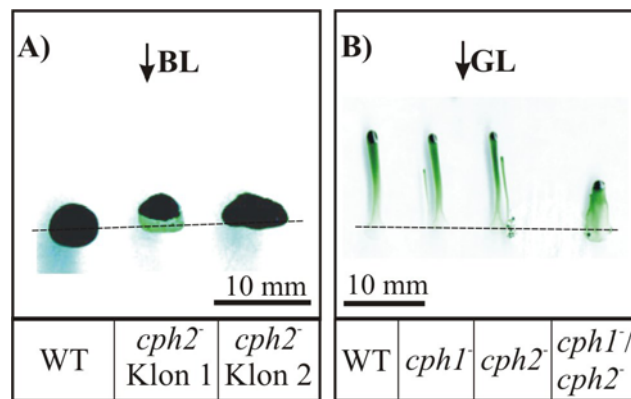




**Abb. 19: Einfluss der externen Zugabe von cAMP und cGMP auf die BL-gesteuerte Motilität von WT und den Phytochrommutanten.**

Weiterhin wurde die Wirkung der Photosyntheseinhibitoren DCMU und DBMIB auf die Zellbewegung von WT und Phytochrommutanten unter BL-Bedingungen untersucht. Zu diesem Zweck wurde den Phototaxisplatten jeweils 0,5 oder 10 μM DCMU bzw. DBMIB zugegeben. Im Fall von DBMIB, das den Elektronenfluss vom Cytochrom-b<sub>6</sub>/f-Komplex auf das Plastocyanin verhindert, konnte keine Auswirkung der Zugabe dieses Inhibitors auf die Motilität des WTs und der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise lieferte die Zugabe von DCMU, das den Elektronenfluss vom PSII in den Plastochinonpool durch Bindung an das D1-Protein unterbricht, höchst unterschiedliche Resultate: Während der WT sich im BL nie bewegte, konnten für *cph2*<sup>-</sup> sowohl Fälle registriert werden, bei denen sich die Mutante normal in Richtung BL-Quelle bewegte, aber auch Fälle, bei denen die Mutante keine Bewegung zeigte. In Abb. 20A ist ein Beispiel für ein Phototaxisexperiment mit DCMU dargestellt, bei dem ein Klon von *cph2*<sup>-</sup> keine und ein weiterer Klon eine geringe positive Phototaxis zeigte.

Das phototaktische Verhalten von WT und Phytochrommutanten auf DCMU-haltigen Platten wurde auch im GL, RL und FRL untersucht. Unter diesen Lichtbedingungen zeigten WT und Phytochrommutanten eine lichtinduzierte Motilität in Richtung der jeweiligen Lichtquelle, wie für GL in Abb. 20B dargestellt. Somit konnte kein Einfluss des Photosyntheseinhibitors DCMU auf die Lichtbewegung im GL, RL und FRL festgestellt werden. Die beobachtete Hemmung der Motilität der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante im BL deutet auf eine mögliche Rolle der photosynthetischen Elektronentransportkette in der Steuerung der Photobewegung im blauen Spektralbereich.

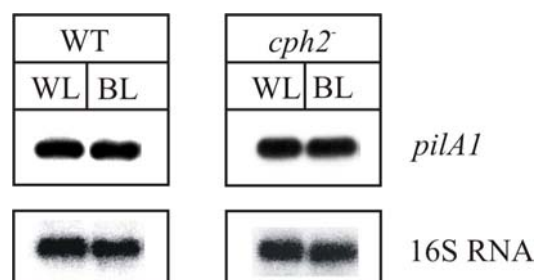


**Abb. 20: Einfluss von DCMU auf das phototaktische Verhalten im BL (A) und GL (B).** Die Agarplatten enthielten 10  $\mu$ M DCMU. Für das in (A) dargestellte Experiment wurden Zellen verwendet, die vorher auf Phototaxisplatten im WL gelaufen waren.

### 3.4.2 Untersuchungen der TypIV-Pili

#### 3.4.2.1 Northern-Blot-Analyse

Wie bereits erwähnt, benötigen die *Synechocystis*-Zellen für die Bewegung spezielle TypIV-Pili. Die Immobilität des WTs im blauen Wellenlängenbereich könnte durch eine eingeschränkte Bildung der TypIV-Pili verursacht werden. Der Pilus besteht hauptsächlich aus dem Strukturelement Pilin. Für die Biogenese der für die Motilität notwendigen Pili ist das pilinkodierende *pilA1*-Gen (Cyanobase: sl11694) notwendig (Bhaya *et al.*, 1999).



**Abb. 21: Northern-Blot-Analyse der *pilA1*-mRNA aus WT- und *cph2*-Zellen.** Für die RNA-Isolation wurden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase für 2 h mit WL bzw. BL belichtet. Die Gesamt-RNA (2  $\mu$ g) wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit einer *pilA1*-spezifischen Sonde hybridisiert. Als Kontrolle wurde eine Sonde gegen die 16S-RNA eingesetzt.

Die Abb. 21 repräsentiert die vergleichende Northern-Blot-Analyse der *pilA1*-Transkriptmenge in WT- und *cph2*-Zellen unter WL- und BL-Bedingungen. Die Abbildung zeigt,

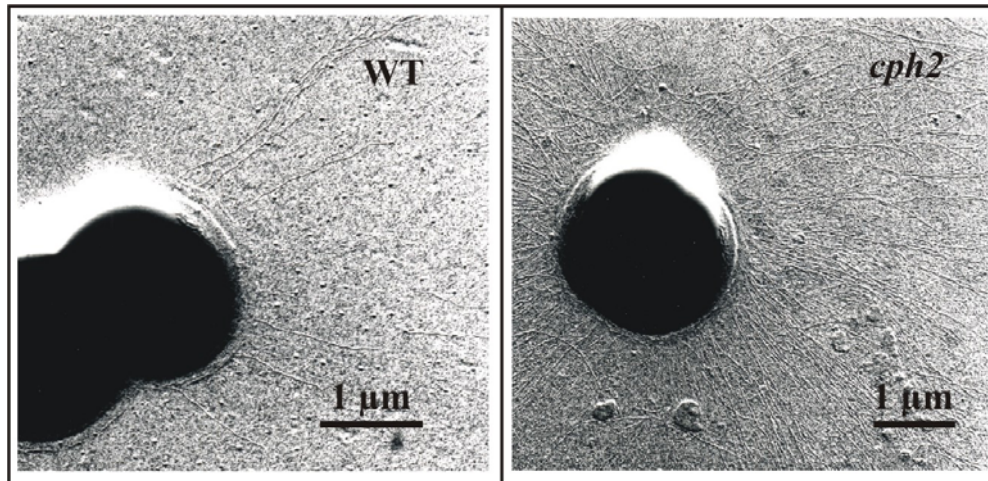
dass die *pilA1*-Transkriptakkumulation durch die Bestrahlung mit BL nicht beeinflusst wurde. Ebenso war die Transkriptmenge im WT gegenüber der Phytochrommutante nicht erkennbar beeinträchtigt. Somit kann der nichtmotile Phänotyp des WT unter BL nicht auf eine eingeschränkte Bildung der TypIV-Pili aufgrund einer verminderten *pilA1*-Transkriptakkumulation zurückgeführt werden.

#### 3.4.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Das Ergebnis aus der Untersuchung der *pilA1*-Expression erlaubt keine Aussage über die tatsächliche Ausprägung der Pili. Die elektronenmikroskopische Analyse der Pili soll Aufschluss über die Anzahl der TypIV-Pili unter BL geben. Hierfür wurden WT- und *cph2*<sup>-</sup>-Zellen von BL- sowie WL-bestrahlten Laufplatten verwendet. Die Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gilbert Tischendorf am Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie der FU Berlin durchgeführt.

Die Pili von *Synechocystis* lassen sich visuell in zwei Typen einteilen: zum einen gibt es feine Pili mit einer geringen Länge sowie lange und kräftige Pili (Abb. 22). Für letztere wurde eine Funktion bei der Motilität nachgewiesen (Bhaya *et al.*, 2000). Der Vergleich elektronenmikroskopischer Bilder verschiedener Versuchsansätze von WT bzw. Mutante unter jeweils gleichen Lichtbedingungen zeigte, dass die Anzahl der langen Pili sehr variabel ist. So besaß der WT in einem Versuchsansatz unter BL-Bedingungen weniger Pili als *cph2*<sup>-</sup> und einem anderen Ansatz hingegen mehr Pili. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist jedoch nichts über den Zusammenhang von Pili-Zahl und Laufgeschwindigkeit bekannt, außer dass eine völlige Abwesenheit von Pili sowie ein Übermaß an Pili („Hyperpilierung“) zu einem Verlust der Motilitätsfähigkeit führt.

Da der WT unter BL weder einen deutlichen Mangel an langen Pili noch eine eindeutige Hyperpilierung aufwies, lässt sich die Ausbildung der Pili nicht gesichert als Ursache für die Immobilität des WTs unter BL festlegen.



**Abb. 22: Beispiele für elektronenmikroskopische Aufnahmen der TypIV-Pili von WT und *cph2*.** Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden Zellen von Phototaxisplatten entnommen, die für ca. zwei Wochen mit BL belichtet wurden. Die Kontrastierung der Pili-Strukturen erfolgte durch Bedampfung mit einer Platin/Paladium-Legierung.

### 3.4.3 Untersuchung der Motilität weiterer Photorezeptormutanten

Die Ergebnisse aus der Untersuchung der Motilität unter BL deuten auf eine Funktion des Photorezeptors Cph2 bei der Regulierung der Zellbewegung unter dieser Lichtbedingung hin. Die Fähigkeit des Cph2-Proteins, im blauen Wellenlängenbereich Licht zu absorbieren, konnte zwar gezeigt werden (Wu und Lagarias, 2000), jedoch erlauben die bisherigen Daten keine Aussagen darüber, ob Cph2 allein für die Inhibierung der Bewegung unter BL verantwortlich ist, oder ob Cph2 mit einem klassischen BL-Rezeptor interagiert. Da sich die *cph2*-Mutante in Richtung BL-Quelle bewegen kann, muss ein weiterer Photorezeptor für die Vermittlung der BL-gesteuerten Motilität vorhanden sein. Dieser unbekannte Photorezeptor kann über die Inaktivierung des kodierenden Gens in der *cph2*-Mutante identifiziert werden.

Bisher ist in Pflanzen das Vorhandensein zweier verschiedener BL-Sensoren, Cryptochrom und Phototropin, beschrieben wurden. Das Genom von *Synechocystis* enthält den ORF sl1629, dessen Genprodukt eine hohe Ähnlichkeit zu dem BL-Rezeptor Cryptochrom aufweist. Hingegen konnte kein ORF gefunden werden, der für ein klassisches Phototropin kodiert. Jedoch besitzt das Genprodukt von slr0359 im N-terminalen Bereich Ähnlichkeit zu den chromophorbindenden LOV-Domänen der Phototropine, sodass eine mögliche Fähigkeit dieses Proteins zur BL-Absorption nicht auszuschließen ist. Von beiden Genen wurden Defektmutanten hergestellt (Tab. 13). Anschließend wurde das photo-

taktische Verhalten dieser Mutanten unter BL-Bedingungen analysiert. Wie in Abb. 23B ersichtlich, zeigten sowohl die *cry*<sup>-</sup> (Mutante mit einem Defekt in *sll1629*; entspricht dem *phrB*-Gen) als auch die *lov*<sup>-</sup>-Mutante (Mutante mit einem Defekt in *slr0359*) keine Motilität unter BL-Bedingungen, wie auch der WT. Die *cry*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>- und die *lov*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante verhielten sich wie die *cph2*<sup>-</sup>-Einzelmutante.

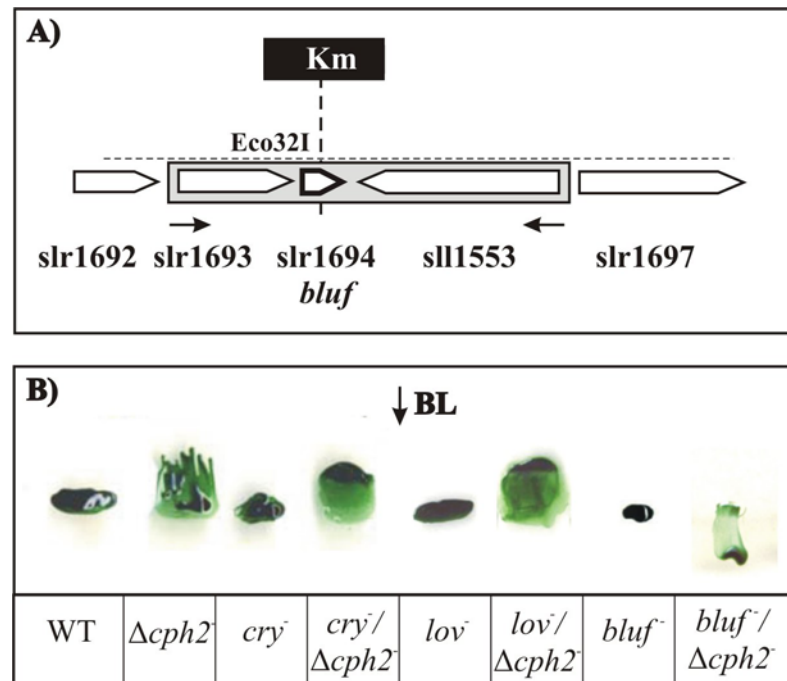
**Tab. 13: Übersicht über die Konstrukte zur Inaktivierung von Genen weiterer potentieller BL-Rezeptoren.**

Gen	Bezeichnung	Antibiotika-kassette	Einbauort
<i>sll1629</i>	<i>cry</i> <sup>-</sup>	Km	HpaI
<i>slr0359</i>	<i>lov</i> <sup>-</sup>	Km	Eco147I-Eco147I
<i>slr1694</i>	<i>bluf</i> <sup>-</sup>	Km	siehe Abb. 23A

AppA ist ein BL-Photorezeptor, der in *Rhodobacter sphaeroides* die Expression von Photosynthesegenen in Abhängigkeit von der BL-Intensität sowie in Abhängigkeit vom Redox-Status der Zelle kontrolliert (Masuda und Bauer, 2002). Das Genom von *Synechocystis* enthält den ORF *slr1694*, dessen Genprodukt im N-terminalen Bereich Ähnlichkeit zu AppA aus *Rhodobacter sphaeroides* besitzt. Das BLUF-Protein in *Synechocystis* besteht weitgehend nur aus der BLUF-Domäne. Eine genaue Funktion dieses Proteins ist bisher nicht bekannt. Allerdings konnte die Fähigkeit des BLUF-Proteins, ein Flavin zu binden, für dieses vermutlich als Trimer oder Tetramer vorliegende Protein nachgewiesen werden (Masuda *et al.*, 2004). Das Gen *slr1694* wurde in *Synechocystis* inaktiviert (Abb. 23A) und die Motilität der Mutante (Bezeichnung: *bluf*<sup>-</sup>) unter BL untersucht. Wie schon *cry*<sup>-</sup> und *lov*<sup>-</sup> wies auch *bluf*<sup>-</sup> unter BL den gleichen Phänotyp wie der WT auf: Auch diese Mutante zeigte keine Motilität unter BL (Abb. 23B). Die *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante unterschied sich in ihrem Laufverhalten von *cry*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup> und *lov*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>. Im Gegensatz zu diesen Mutanten bewegte sich *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup> von der Lichtquelle fort.

Die beschriebenen Resultate aus der Untersuchung der BL-abhängigen Bewegung von Mutanten mit einem inaktivierten potentiellen BL-Photorezeptor deuten nicht auf eine Interaktion zwischen dem cyanobakteriellen Phytochrom Cph2 und Proteinen mit Ähn-

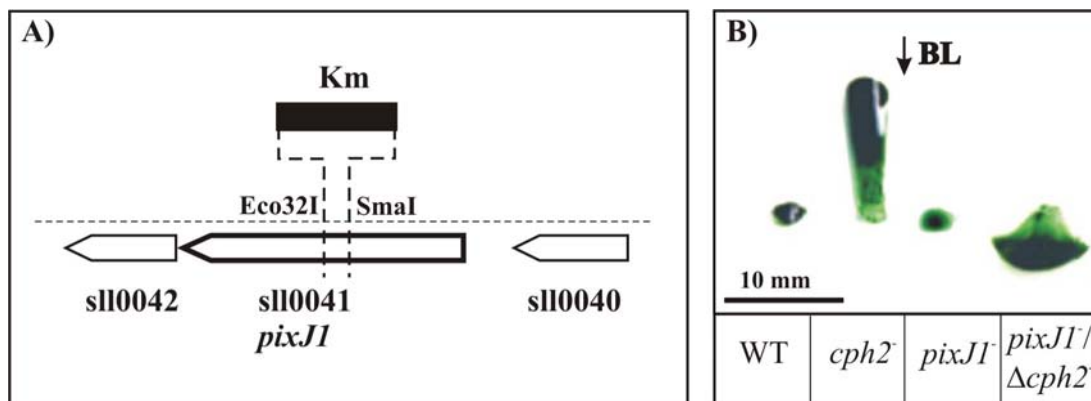
lichkeit zu den klassischen BL-Photorezeptortypen Cryptochom und Phototropin sowie den BLUF-Proteinen. Auch ließ sich diesen Proteinen keine Funktion bei der BL-gesteuerten Motilität in der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante zuordnen, wobei jedoch das BLUF-Protein in *Synechocystis* bei der Vermittlung der positiven Phototaxis im BL eine Rolle zu spielen scheint.



**Abb. 23: Schema des *bluf*-Konstrukts (A) und Motilität potentieller BL-Rezeptoren unter BL-Bedingungen (B).** Das *bluf*-Gen ist mit ca. 500 bp relativ kurz. Daher wurden für die Inaktivierung des *bluf*-Gens die benachbarten Gene ebenfalls amplifiziert. Der ORF *slr1693* kodiert für einen Response-Regulator von PatA-Typ und *sll1553* für eine Phenylalanyl-tRNA-Synthetase. Die Pfeile geben die Position der Primer (ca. 150 bp vor dem jeweiligen Translationsstartpunkt) zur Amplifikation des Genabschnittes an.  $\Delta cph2$  stellt eine Mutante von *cph2* dar, bei der das Gen vollständig entfernt wurde (Abb. 8). Dieser Mutantentyp wies das gleiche phototaktische Verhalten im BL auf wie die *cph2*-Variante.

Für das phytochromähnliche Protein PixJ1 konnte gezeigt werden, dass dieser Photorezeptor eine Rolle bei der Vermittlung der positiven Phototaxis spielt (Yoshihara *et al.*, 2000; Bhaya *et al.*, 2001a). Unter BL-Bedingungen ist die Motilität des WT in Richtung Lichtquelle gehemmt. Daher ist es von Interesse, wie sich die Mutation von *pixJ1* bzw. eine Doppelmutation dieses Gens und *cph2* auf das Laufverhalten unter BL auswirkten. Zu diesem Zweck wurde eine *pixJ1*-Mutation nach dem in Abb. 24A skizzierten Schema im WT und der Cm-resistenten  $\Delta cph2$  erzeugt. Die Motilität von *pixJ1*<sup>-</sup> sowie der Doppelmutante wurde unter BL sowie unter FRL, RL und GL untersucht. Unter den letztgenannten Lichtbedingungen verhielten sich *pixJ1*<sup>-</sup> und die Doppelmutante entgegengesetzt

zum WT und *cph2*<sup>-</sup>, d. h. während sich WT und *cph2*<sup>-</sup> zum Licht bewegten, zeigten *pixJ1*<sup>-</sup> und *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup> negative Phototaxis (Tab. 14). Die Inaktivierung von *pixJ1* übte jedoch keinen Einfluss auf das Verhalten des WTs im BL aus: *PixJ1*<sup>-</sup> zeigte wie der WT keine Motilität im BL (Abb. 24B). Die unter anderen Lichtbedingungen beobachtete negative Phototaxis von *pixJ1*<sup>-</sup> trat nur auf, wenn zusätzlich *cph2* inaktiviert war (Abb. 24B).



**Abb. 24:** Schema zur Konstruktion der *pixJ1*-Mutante (A) und phototaktisches Verhalten von *pixJ1* sowie der *pixJ1*/*Δcph2*-Doppelmutante unter unidirektionaler Einstrahlung von BL (B).

*PixJ1*<sup>-</sup> und *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup> verhielten sich im BL genauso wie *bluf*<sup>-</sup> und *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>, d. h. die *pixJ1*-Einzelmutante war nicht motil während sich die Doppelmutante von der Lichtquelle fortbewegte.

Das Laufverhalten von *bluf*<sup>-</sup> und *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup> im GL und FRL unterschied sich jedoch von *pixJ1*<sup>-</sup> und *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>. Unter diesen Lichtbedingungen zeigte *bluf*<sup>-</sup> und die Doppelmutante keine oder nur eine sehr schwache Motilität (Tab. 14). Im RL hingegen wiesen *bluf*<sup>-</sup> und *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup> wie *pixJ1*<sup>-</sup> und *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup> eine negative Phototaxis auf (Tab. 14). Insgesamt deuten die Daten aus dem Phototaxis-Assay darauf, dass BLUF in *Synechocystis* ebenfalls in die Steuerung der positiven Phototaxis involviert sein könnte, wobei jedoch *PixJ1* und BLUF die Regulation der Motilität vermutlich über getrennte Signalketten steuern.

Die Motilität von *cry*<sup>-</sup> und *lov*<sup>-</sup> sowie deren *cph2*<sup>-</sup>-Doppelmutanten wurden ebenfalls unter FRL, RL und GL untersucht. Jedoch konnte für diese Photorezeptormutanten keine Abweichungen im Laufverhalten gegenüber dem WT festgestellt werden (Tab. 14). Unter den hier eingesetzten Lichtbedingungen konnte den beiden potentiellen Lichtsensoren *Cry*

und LOV keine Funktion bei der Regulierung der lichtinduzierten Motilität nachgewiesen werden.

**Tab. 14: Phototaktisches Verhalten von *pixJ1*<sup>-</sup>, *bluf*<sup>-</sup>, *cry*<sup>-</sup> und *lov*<sup>-</sup> sowie der Doppelmutanten im GL, RL und FRL.**

Stamm	GL	RL	FRL
WT	positiv	positiv	positiv
<i>pixJ1</i> <sup>-</sup>	negativ	negativ	negativ
<i>pixJ1</i> <sup>-</sup> / <i>Δcph2</i> <sup>-</sup>	negativ	negativ	negativ
<i>bluf</i> <sup>-</sup>	stark eingeschränkte Motilität	negativ	stark eingeschränkte Motilität
<i>bluf</i> <sup>-</sup> / <i>Δcph2</i> <sup>-</sup>	stark eingeschränkte Motilität	negativ	stark eingeschränkte Motilität
<i>cry</i> <sup>-</sup>	positiv	positiv	positiv
<i>cry</i> <sup>-</sup> / <i>Δcph2</i> <sup>-</sup>	positiv	positiv	positiv
<i>lov</i> <sup>-</sup>	positiv	positiv	positiv
<i>lov</i> <sup>-</sup> / <i>Δcph2</i> <sup>-</sup>	positiv	positiv	positiv

Das phytochromähnliche Protein Plp beeinflusst das photoautotrophe Wachstum unter BL (Wilde *et al.*, 1997). Daraus resultiert die Frage, ob PlpA auch eine Funktion bei der Steuerung der BL-Motilität ausübt. Hierfür wurden Zellen einer *plpA*<sup>-</sup>-Mutante (zur Konstruktion der Mutante siehe Tab. 15) auf glukosehaltige Agarplatten aufgetragen und die Motilität unter BL und zusätzlich unter FRL, RL und GL getestet. Wie der WT zeigte die *plpA*<sup>-</sup>-Mutante keine Bewegung entlang eines BL-Gradienten (Tab. 15). Auch nach Belichtung mit FRL, RL und GL unterschied sich *plpA*<sup>-</sup> nicht vom WT: Wie der WT wanderten die Mutanten in Richtung Lichtquelle (Tab. 15).

Neben PixJ1 und PlpA wurde auch der Einfluss weiterer phytochromähnlicher Proteine auf die Richtungswahrnehmung bei der phototaktischen Bewegung untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mutanten mit einem Defekt in den Genen *sll1473*, *slr1393* und *slr1969* erzeugt (Tab. 15). Anschließend wurde die Motilität der Mutantenzellen unter FRL, RL, GL



und BL analysiert. Das Ergebnis der Untersuchungen zeigte, dass unter den getesteten Lichtbedingungen die Genprodukte von *sll1473*, *slr1393* und *slr1969* keinen Einfluss auf die Steuerung der Bewegungsrichtung ausüben: Unter BL konnte keine Bewegung der entsprechenden Mutanten *1473<sup>-</sup>*, *1393<sup>-</sup>* und *1969<sup>-</sup>* beobachtet werden. Hingegen waren die Mutantenzellen zur einer Bewegung in Richtung FRL, RL und GL befähigt (Tab. 15). Damit demonstrierten *1473<sup>-</sup>*, *1393<sup>-</sup>* und *1969<sup>-</sup>* unter allen Lichtbedinungen WT-Verhalten.

**Tab. 15: Phototaktisches Verhalten von Mutanten mit einem inaktivierten phytochromähnlichen Protein unter verschiedenen Lichtbedingungen.**

Gen	Bezeichnung	Antibiotika-kassette	Einbauort	Motilität unter BL	Motilität unter FRL, RL, GL
-	WT	-	-	nicht motil	motil
<i>plpA</i> ( <i>sll1124</i> )	<i>plpA<sup>-</sup></i>	Km	EcoRI-EcoRI	nicht motil	motil
<i>sll1473</i>	<i>1473<sup>-</sup></i>	Cm	BsaBI	nicht motil	motil
<i>slr1393</i>	<i>1393<sup>-</sup></i>	Cm	BsaBI-BsaBI	nicht motil	motil
<i>slr1969</i>	<i>1969<sup>-</sup></i>	Km	EheI	nicht motil	motil

Insgesamt konnte für die phytochromähnlichen Proteine PlpA, Sll1473, Slr1393 und Slr1969 sowie für die potentiellen BL-Rezeptoren Cry und LOV keine Funktion in der Steuerung der lichtinduzierten Motilität nachgewiesen werden. Die beiden Lichtsensoren PixJ1 und BLUF spielen eine Rolle in der Vermittlung der positiven Phototaxis.

### 3.5 Analyse der IS-Elemente im *Synechocystis* –Chromosom

*Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde vor einigen Jahrzehnten aus einem kalifornischen See isoliert. Seitdem wird dieser Stamm in zahlreichen Laboratorien weltweit kultiviert und für Forschungszwecke eingesetzt. Während dieser langen Zeit stellte sich heraus, dass der Stamm in verschiedenen Laboratorien keinen einheitlichen Phänotyp besitzt. So existieren glukosetolerante wie auch glukosesensitive Stämme sowie motile als auch unbewegliche

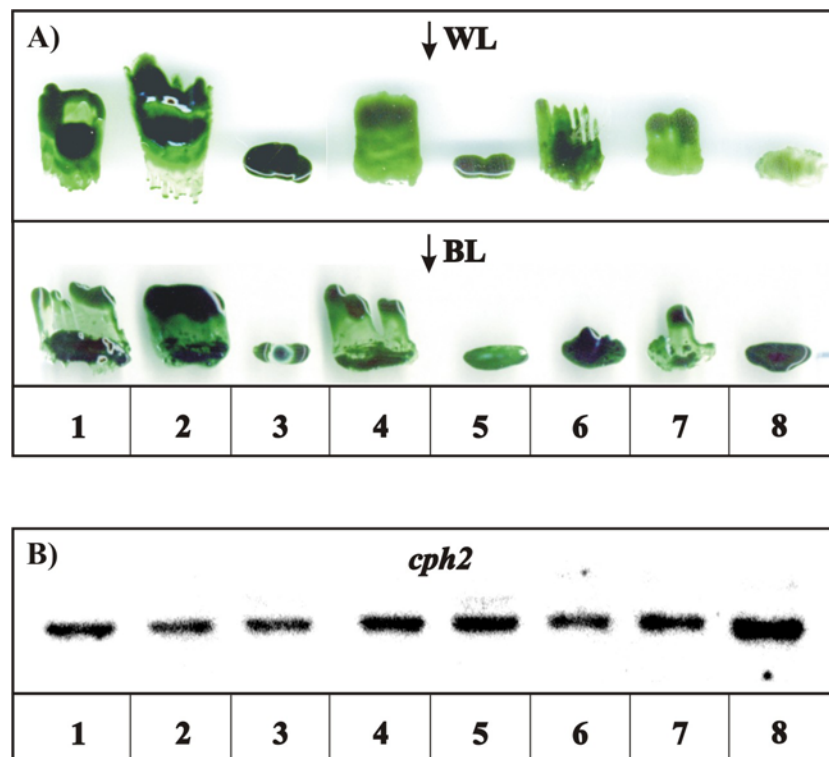
*Synechocystis*-Varianten (Ikeuchi und Tabata, 2001). Es besteht die Möglichkeit, dass die ursprünglich isolierten *Synechocystis*-Zellen nicht genotypisch einheitlich waren. Dies trifft jedoch laut R. Rippka nicht zu (mündliche Mitteilung). Bei der Entstehung dieser Variabilität könnten IS-Elemente eine Rolle gespielt haben. Infolge der Genomanalyse des durch eine japanische Arbeitsgruppe sequenzierten WT-Stammes konnten 77 IS-ähnliche Elemente ermittelt werden, die sich hinsichtlich ihrer terminalen, invers repetitiven Sequenzen in 9 Gruppen einteilen lassen (Ikeuchi und Tabata, 2001). Insgesamt 26 der gefundenen IS-Elemente enthalten einen ORF, der für eine Transposase kodiert. Die ISY203-Gruppe ist als transpositionsaktiv bekannt. So ist der ORF sll1473, der für ein phytochromähnliches Protein kodiert, wahrscheinlich nur in der sequenzierten Stamm-Variante durch ein Transposon dieser Gruppe unterbrochen (Okamoto *et al.*, 1999).

### 3.5.1 Vergleich des phototaktischen Verhaltens verschiedener WT-Varianten von *Synechocystis*

Wie bereits erwähnt, existieren motile und nichtmotile Varianten des *Synechocystis*-Stammes PCC 6803. Ähnliche Variationen innerhalb des Stammes könnten auch hinsichtlich der Regulation der BL-gesteuerten Motilität bestehen. Bestärkt wird diese Vermutung durch eine Veröffentlichung einer koreanischen Arbeitsgruppe, in der die Fähigkeit des WT zur Phototaxis innerhalb eines BL-Gradienten beschrieben werden konnte (Choi *et al.*, 1999). Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse aus der vergleichenden Analyse der BL-gesteuerten Motilität von PCC 6803-Varianten aus unterschiedlichen Laboratorien dargestellt.

Für die Untersuchungen der Motilität wurden acht WT-Stämme eingesetzt. Von den getesteten Stämmen zeigten drei unter WL keine phototaktische Bewegung (Abb. 25A). Dazu gehört unter anderem die Kazusa-Stamm-Variante (Nr. 3 in Abb. 25A), der für die Sequenzierung des Genoms verwendet wurde. Aus der gleichen Abbildung geht hervor, dass die in unserer Arbeitsgruppe verwendete WT-Variante (Nr. 6 in Abb. 25B) der einzige motile WT ist, dessen Bewegung unter BL gehemmt ist. Da der beobachtete Phänotyp der übrigen motilen WT-Varianten dem der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante entspricht, wurde das Vorhandensein des *cph2*-Gens in den WT-Stämmen mittels Southern-Blot-Analyse überprüft. Diese zeigte, dass das Gen in allen untersuchten WT-Varianten existiert (Abb. 25B). Jedoch erlaubt diese Methode keine Aussage über die Funktionstüchtigkeit des *cph2*-Gens in diesen WT-

Stämmen. Somit könnte die Aufhebung der Inhibition der BL-abhängigen Motilität durch die Inaktivierung des *cph2*-Gens möglicherweise nur bei unserem WT beobachtbar sein.



**Abb. 25:** Lichtinduzierte Motilität verschiedener WT-Stämme von *Synechocystis* in Abhängigkeit vom WL und BL (A) sowie Southern-Blot-Analyse des *cph2*-Gens in jenen WT-Varianten (B). Für die Southern-Blot-Analyse wurde die mit dem Restriktionsenzym HindIII fragmentierte chromosomale DNA mit einer Sonde gegen *cph2* hybridisiert. Eine Aufschlüsselung der Nummern ist in Tab. 3 im Kap. 2.1.8.1 dargestellt. In der Spur Nr. 6 ist die DNA des WT aufgetragen, der für die Inaktivierung der Gene *cph1* und *cph2* verwendet wurde.

### 3.5.2 Untersuchung der BL-induzierten Motilität ausgewählter Photorezeptor-mutanten verschiedener WT-Varianten von *Synechocystis*

Der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete WT (Nr. 6) unterschied sich hinsichtlich seiner Motilität im BL von anderen motilen WT-Varianten. Unter den getesteten BL-Bedingungen war dieser nicht zu einer Bewegung entlang eines BL-Gradienten befähigt, während andere motile WT-Stämme dies vermochten (Abb. 25A). Es besteht die Möglichkeit, dass die WT-Variante Nr. 6 eine Mutation in einem Gen besitzt, das einen BL-Photorezeptor kodiert. In diesem Fall könnte die Inaktivierung des *cph2*-Gens die Auswirkung dieser Mutation kompensieren. Zu diesem Zweck wurden die in Kap. 3.4.3

beschriebenen Konstrukte verwendet, um die entsprechenden Gene für potentielle BL-Photorezeptoren in den WT-Stämmen Nr. 2 und 4 zu inaktivieren. Anschließend wurde die Motilität der gewonnenen Mutanten unter BL untersucht.

Wie in Tab. 16 gezeigt, verhielten sich die *cry*<sup>-</sup>- und *lov*<sup>-</sup>-Mutante der WT-Variante Nr.2 und Nr.4 wie die entsprechenden WTen. Die Fähigkeit der Mutanten, sich in Richtung BL zu bewegen, blieben erhalten. Die *bluf*<sup>-</sup>-Mutante war zwar ebenfalls im BL motil, jedoch wurde hier sowohl positive als auch negative Phototaxis beobachtet. Weiterhin wurden Mutanten mit einem inaktivierten Gen von *plpA*, *slr1969* und *slr1473* hergestellt, welche phytochromähnliche Proteine kodieren, die möglicherweise BL absorbieren können (Wilde *et al.*, 1997; Wu und Lagarias, 2000). Auch diese Mutanten zeigten, wie der dazugehörige WT, Motilität in Richtung BL (Tab. 16).

Somit kann eine Mutation in den Genen *cry*, *lov*, *bluf*, *plpA*, *slr1473* und *slr1969* nicht die Ursache für das nichtmotile Verhalten der WT-Variante (Nr. 6) unserer Arbeitsgruppe sein.

**Tab. 16: Phototaktisches Verhalten verschiedener Mutanten potentieller BL-Photorezeptoren und phytochromähnlicher Proteine in den WT-Varianten WT Nr.2 und Nr.4 im BL.** Diese beiden WT-Varianten besitzen die Fähigkeit, sich in Richtung BL zu bewegen. Somit zeigten diese beiden WT-Varianten bezüglich der BL-gesteuerten Motilität die gleichen Eigenschaften wie *cph2*<sup>-</sup>. Zur Inaktivierung der Gene, welche die potentiellen BL-Photorezeptoren kodieren, wurden die in Tab. 13 und Tab. 15 aufgelisteten Konstrukte verwendet.

	WT Nr.2	WT Nr.4
WT	motil	motil
Mutanten: <i>cry</i> <sup>-</sup>	motil	motil
<i>lov</i> <sup>-</sup>	motil	motil
<i>bluf</i> <sup>-</sup>	motil <sup>b)</sup>	motil <sup>b)</sup>
<i>plpA</i> <sup>-</sup>	motil	motil
<i>1473</i> <sup>-</sup>	motil	n. u. <sup>a)</sup>
<i>1969</i> <sup>-</sup>	motil	n. u. <sup>a)</sup>

a) n. u. - nicht untersucht

b) Sowohl positive als auch negative Phototaxis wurde beobachtet.

### 3.5.3 Analyse der IS-Elemente über Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Die in unserer Arbeitsgruppe genutzte WT-Variante (Nr. 6) unterscheidet sich unter BL-Bedingungen in ihrem Phänotyp von anderen Varianten von *Synechocystis* sp. PCC 6803. Von allen untersuchten WT-Varianten mit der Fähigkeit zur lichtinduzierten Motilität war der WT Nr. 6 die einzige WT-Variante, die im BL keine Zellbewegung zeigte (Abb. 25A). Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen könnten die 77 IS-Elemente im *Synechocystis*-Chromosom sein.

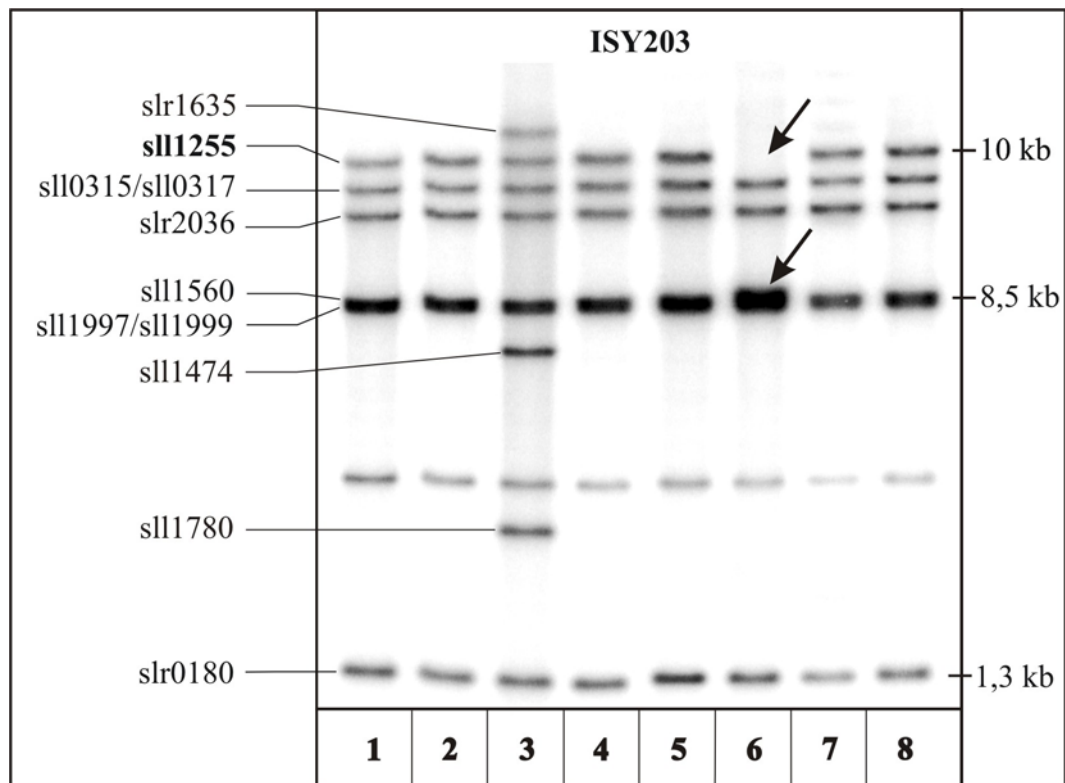
Die IS-Elemente der ISY203-Gruppe sind als transpositionsaktiv bekannt (Okamoto *et al.*, 1999). So konnten im Genom der zur Sequenzierung benutzten Kazusa-WT-Variante (Nr. 3 in Abb. 26) gleich drei zusätzliche IS-Elemente dieses Typs gegenüber dem zweier anderer WT-Varianten ermittelt werden. Daher wurden zunächst durch die RFLP-Analyse mittels Southern-Blot-Technik die Anzahl der IS-Elemente aus dieser Gruppe sowie die möglichen Änderungen ihrer Positionen im Chromosom bestimmt. Hierfür wurde die chromosomale DNA verschiedener WT-Varianten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Die fragmentierte DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die DNA-Fragmente, auf denen sich ein IS-Element befindet, wurden durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen die IS-Elemente der ISY203-Gruppe sichtbar gemacht. Die Zuordnung der verschiedenen IS-Elemente zu den markierten Banden im Southern-Blot erfolgte über die Berechnung der zu erwartenden Fragmentgrößen der geschnittenen DNA. Die Größe der Hybridisierungsbanden wurde mit Hilfe von DNA-Markern bestimmt.

In Abb. 26 ist ein Beispiel für einen Southern-Blot dargestellt, bei dem die DNA mit dem Restriktionsenzym Eco32I geschnitten wurde. In Spur 6 wurde die DNA der WT-Variante (Nr. 6) aus unserer Arbeitsgruppe aufgetragen. Im Gegensatz zu allen anderen getesteten WT-Varianten fehlte bei diesem WT die Hybridisierungsbande im Größenbereich von 10 kb, die das IS-Element sll1255 enthalten soll (Abb. 26). Stattdessen erschien eine neue Bande im Größenbereich von 8,5 kb. In diesem Bereich befinden sich auch die DNA-Fragmente, welche die IS-Elemente vom ISY203-Typ sll1560 bzw. sll1997/sll1999 enthalten. Aufgrund der Überlagerung durch drei markierte Fragmente kam es zu einer Verstärkung des Hybridisierungssignals. Die Verschiebung der 10kb-Hybridisierungsbande

in den Bereich kürzerer Fragmentlängen bedeutet entweder, dass das IS-Element sll1255 an eine andere Stelle im Genom unserer WT-Variante gesprungen ist oder, dass durch eine Änderung in der Genomsequenz eine neue Erkennungsstelle für Eco32I und damit ein verkürztes Fragment entstanden ist.

Die DNA der einzelnen WT-Varianten wurde auch mit anderen Restriktionsenzymen fragmentiert. Bei der Verwendung der Enzyme HindIII und EcoRI wurde ebenfalls ein verändertes Hybridisierungsmuster ermittelt (Abbildungen nicht gezeigt), das stets auf das Fragment hinwies, auf dem sich das IS-Element sll1255 befindet. Dies deutet darauf hin, dass es im Genom unserer WT-Variante zu größeren Änderungen gekommen sein muss als zum Austausch einzelner Basenpaare, welche die Erkennungssequenz nur eines Restriktionsenzymen betreffen. Somit hat sich sll1255 entweder an eine andere Stelle im Genom eingebaut, oder dieses IS-Element ist nicht gesprungen, aber es liegt eine größere Veränderung in dem Genombereich vor, in dem sich sll1255 befindet.

Wie bereits erwähnt, besitzt der Kazusa-WT-Stamm drei zusätzliche IS-Elemente (sll1474, sll1780 und slr1635) vom ISY203-Typ, die in anderen WT-Varianten nicht gefunden wurden (Okamoto *et al.*, 1999). Das Vorhandensein dieser IS-Elemente im Genom der Kazusa-WT-Variante (Nr. 3 in Abb. 26) konnte bestätigt werden und konnte bei keinem der hier verwendeten WT-Varianten gezeigt werden (Abb. 26).



**Abb. 26: RFLP-Analyse der zur ISY203-Gruppe gehörigen IS-Elemente im Genom von *Synechocystis*.** Die genomische DNA verschiedener WT-Stämme wurde mittels des Restriktionsenzym *Eco32I* geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA auf einen Filter wurde diese mit einer ISY203-spezifischen Sonde hybridisiert. Eine Aufschlüsselung der Nummern ist in Tab. 3 im Kap. 2.1.8.1 dargestellt. In der Spur Nr. 6 ist die DNA des WT aufgetragen, der für die Inaktivierung der Gene *cph1* und *cph2* verwendet wurde.

**Tab. 17: Analyse der IS-Elemente im Genom der WT-Variante Nr. 6 unserer Arbeitsgruppe und deren Änderung gegenüber dem Genom anderer motiler WT-Stämme von *Synechocystis*.** Die Tabelle fasst die Ergebnisse aus mehreren RFLP-Analysen zusammen, für die mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnittene DNA eingesetzt wurde.

Gruppe	Anzahl der IS-Elemente im Kazusa-Stamm <sup>a)</sup>	Änderung im Genom
ISY100	33	ja
ISY120	7	nein
ISY203	11	ja
ISY352	11	nein
ISY391	5	nein
ISY508	6	ja

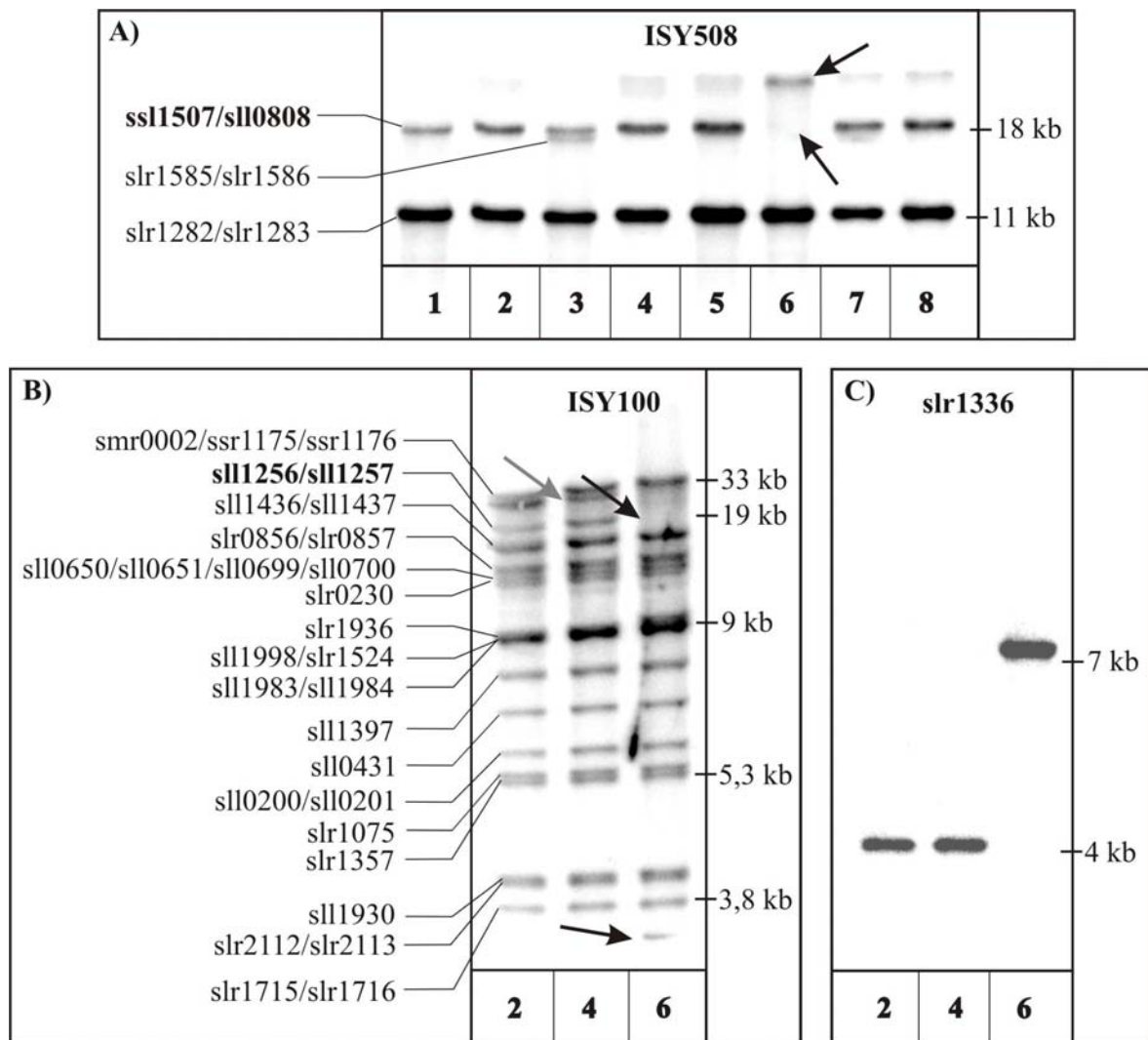
Gruppe	Anzahl der IS-Elemente im Kazusa-Stamm <sup>a)</sup>	Änderung im Genom
ISY523	19	nein
ISY802	6	nein
übrige	14	nein

a) laut Cyanobase-Datenbank

Die DNA wurde auch mit Sonden gegen die übrigen IS-Gruppen hybridisiert. Während bei ISY120, ISY391, ISY523, ISY802 keine Änderung im Hybridisierungsmuster der DNA aus der WT-Variante Nr. 6 gegenüber den übrigen zu finden war (Tab. 17), unterschied sich das Muster im Fall von ISY100 und ISY508. Auch hier waren Abweichungen in der Abfolge der Banden bei der Verwendung bestimmter Restriktionsenzyme zu beobachten.

Die Abb. 27A zeigt ein Autoradiogramm, bei dem die DNA mit einer Sonde gegen die IS-Elemente der ISY508-Gruppe hybridisiert wurde. Laut Cyanobase sollten auf dem Autoradiogramm drei Banden für Fragmente zu finden sein, welche die IS-Elemente sll0808/ssl1507, slr1585/slr1586 und slr1282/slr1283 enthalten. Zum ISY508-Typ gehören sechs IS-Elemente. Da jedoch jeweils zwei dieser IS-Elemente im Genom direkt nebeneinander angeordnet sind und das verwendete Restriktionsenzym Eco32I weder innerhalb des ORF noch zwischen den ORFs schneidet, befinden sich je zwei der IS-Elemente auf einem Fragment. Die drei Hybridisierungsbanden lassen sich im Autoradiogramm nur in der Spur 3 finden (Abb. 27A), auf dem die fragmentierte DNA der Kazusa-WT-Variante aufgetragen wurde. Bei den übrigen WT-Varianten fehlte die Hybridisierungsbande, welche die beiden IS-Elemente slr1585 und slr1586 enthält. Eine neue Hybridisierungsbande in einem anderen Größenbereich konnte nicht erfasst werden. Somit enthält das Genom der Kazusa-WT-Variante zwei weitere zusätzliche IS-Elemente neben den bereits bekannten sll1474, sll1780 und slr1635 vom ISY203-Typ.





**Abb. 27: RFLP-Analyse der IS-Elemente aus den Gruppen ISY508 (A) und ISY100 (B) sowie des Gens *slr1336* (C).** Für die Hybridisierung mit einer Sonde gegen ISY100 und ISY508 wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Eco32I* geschnitten. Die chromosomale DNA für die RFLP-Analyse des *slr1336*-Gens wurde mit der Endonuklease *XbaI* fragmentiert. Eine Aufschlüsselung der Nummern ist in Tab. 3 im Kap. 2.1.8.1 dargestellt. In der Spur Nr. 6 ist die DNA des WT aufgetragen, der für die Inaktivierung der Gene *cph1* und *cph2* verwendet wurde.

Die genomische DNA unserer WT-Variante unterschied sich ebenfalls im Hybridisierungsmuster von der DNA der übrigen *Synechocystis*-Varianten nach Markierung des Filters mit einer Sonde gegen die IS-Elemente der ISY508-Gruppe. Im Autoradiogramm fehlte die Hybridisierungsbande, die sll0808 und ssl1507 enthält. Stattdessen erscheint im Bereich größerer DNA-Fragmente eine neue Hybridisierungsbande (Nr. 6 in Abb. 27A). Somit müssen die beiden benachbarten IS-Elemente entweder an eine andere Stelle im Genom gesprungen sein, oder in der ursprünglichen Erkennungssequenz des *Eco32I*-Restriktionsenzym fand ein Basenpaaraustausch statt, so dass nun ein verlängertes

Fragment entstand.

Wurde die DNA mit einer Sonde gegen die IS-Elemente der ISY100-Gruppe hybridisiert, konnten für die genomische DNA unserer WT-Variante ebenfalls Abweichungen im Hybridisierungsmuster im Vergleich zu zwei anderen WT-Varianten festgestellt werden (Abb. 27B). Die Bande, die mit den beiden benachbarten IS-Elementen *sll1256* und *sll1257* hybridisiert, war nicht vorhanden. Dafür fand sich im Bereich zwischen 3 und 3,8 kb eine neue Bande. Auch hier muss sich eine Transposition von *sll1256* und *sll1257* ereignet haben, oder durch Basenpaaraustausche ist eine neue Erkennungsstelle für das hier verwendete Restriktionsenzym *Eco32I* entstanden.

In dem Autoradiogramm (Abb. 27B) ist in den beiden Spuren, in denen die DNA der WT-Varianten Nr. 2 und 4 aufgetragen wurden, eine zusätzliche Hybridisierungsbande im Größenbereich um 33 kb zu erkennen, die keiner der bekannten IS-Elemente aus der ISY100-Gruppe zugeordnet werden konnte. Im Gegenzug konnten drei IS-Elemente (*ssl0426*, *sll1436* und *sll1437*), die im Genom nebeneinander liegen, im Autoradiogramm nicht identifiziert werden. Somit könnten diese drei IS-Elemente im Genom unserer WT-Variante nicht vorhanden und in dem Genom der beiden anderen untersuchten WT-Varianten an eine andere Stelle gesprungen sein (Die Analyse der DNA der Kazusa-WT-Variante ist in Abb. 27B nicht dargestellt.).

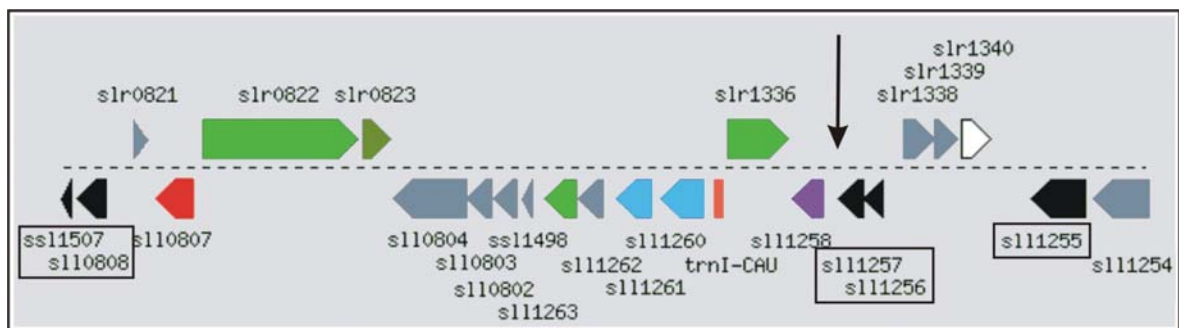
Betrachtet man die Lokalisation der IS-Elemente *sll1255* (ISY203), *ssl1507/sll0808* (ISY508) und *sll1256/sll1257* (ISY100) im Genom, so fällt auf, dass diese sich alle in derselben Genomregion befinden (Abb. 28). Daher könnten alle die in der RFLP-Analyse beobachteten Unterschiede im Hybridisierungsmuster unserer WT-Variante im Vergleich zu anderen Varianten auf Veränderungen innerhalb dieser Genomregion zurückzuführen sein.

Um die Veränderung in der genomischen Region um *sll1255* exakter bestimmen zu können, wurde von dieser eine Minibank angefertigt. Die anschließende Sequenzierung klärte, dass unmittelbar *upstream* von *sll1257* eine Insertion durch eine DNA erfolgt ist, deren Sequenz eine hohe Ähnlichkeit zu dem Plasmid pSYSG aus *Synechocystis* aufweist. Das genaue Ausmaß der Insertion konnte nicht ermittelt werden, da das für die Herstellung der Minibank verwendete Restriktionsenzym *HindIII* in der inserierten DNA-Sequenz schnitt.

In der Region *upstream* von *sll1257* befindet sich der ORF *slr1336*, welcher für einen potentiellen  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter kodiert. Dieses Protein ist für die Erklärung der fehlenden

Motilität unserer WT-Variante im BL interessant, da Kalzium die Motilität von *Synechocystis* beeinflusst (Moon *et al.*, 2004). Der ORF *slr1258* kodiert für eine dCTP-Deaminase. Ein Defekt in diesem Gen ist wahrscheinlich nicht die Ursache für den nichtmotilen Phänotyp unseres WTs.

Für *slr1336* wurde eine RFLP-Analyse durchgeführt, wobei eine Sonde verwendet wurde, die nur mit diesem Gen hybridisiert. Nach den errechneten Fragmentgrößen sollte im Autoradiogramm eine Hybridisierungsbande im Bereich um 4 kb zu finden sein. Wie in Abb. 27C zu sehen, konnte zwar bei unserer WT-Variante (Nr. 6) ein Hybridisierungssignal für *slr1336* registriert werden, jedoch befand sich die Bande in einem Größenbereich um 7 kb.



**Abb. 28: Genombereich, in dem sich das IS-Element *ssl1257* befindet.** Die Abbildung repräsentiert einen Ausschnitt einer in der Cyanobase erhältlichen Genkarte dieser Region. Die IS-Elemente innerhalb dieser Genomregion sind durch Kästchen hervorgehoben. Der Pfeil markiert die Position der Insertion der pSYSG-Sequenz. Der ORF *ssl1258* kodiert für eine dCTP-Deaminase und der ORF *slr1336* für einen potentiellen  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter. Die Farben symbolisieren Kategorien, nach denen die Gene hinsichtlich der zu erwartenden Funktion ihrer Genprodukte eingeteilt sind. weiß: Proteine unbekannter Funktion; grau: hypothetische Proteine; schwarz: andere Kategorien; lila: Biosynthese von Purinen, Pyrimidinen, Nukleosiden, Nukleotiden; blau: Translation; grün: Transport; oliv: Photosynthese und Respiration; orange: RNA; rot: Energie-Metabolismus. Die Bezeichnung der Katagorien stammt aus der Cyanobase.

Ob die Verlängerung des Fragments allein durch die Insertion der pSYSG-Sequenz zwischen *ssl1257* und *slr1336* hervorgerufen wurde, oder ob es zu größeren Umlagerungsprozessen in diesem Genombereich mit Auswirkung auf die Transkription von betroffenen Genen kam, lässt sich jedoch mit dieser RFLP-Analyse nicht bestimmen. Genauere Aussagen sind nur durch eine Sequenzierung dieses Genombereichs möglich.

Anhand von RFLP-Analysen konnte belegt werden, dass sich die WT-Variante von *Synechocystis* aus unserer Arbeitsgruppe genotypisch von anderen WT-Varianten unter-

scheidet. Allerdings können noch weitere Änderungen im Genom unserer am intensivsten untersuchten WT-Variante aufgetreten sein, die bisher noch nicht identifiziert wurden. Ob die gefundene Änderung in der Genomregion, in der sich u. a. das IS-Element sll1257 befindet, tatsächlich die Ursache für die fehlende Motilität unserer WT-Variante im BL ist, kann durch die RFLP-Analyse nicht geklärt werden. Dazu sind weitere Untersuchungen erforderlich, wie z. B. Mutantenanalysen und die Komplementation mit einer DNA-Bank von anderen WT-Varianten.

Die meisten Abweichungen in der Anzahl von IS-Elementen zeigte der Kazusa-WT-Stamm, der für die Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis* sp. PCC 6803 verwendet wurde.

## 4 DISKUSSION

Die Phytochrome regulieren in Pflanzen verteilt über den gesamten Lebenszyklus eine Reihe von photomorphogenetischen Prozessen, beginnend mit Steuerungsvorgängen bei der Samenkeimung, der De-Etiolierung der Keimlinge, Prozessen zur Schattenvermeidung, Einstellung der circadianen Uhr und Blüteninduktion (Sullivan und Deng, 2003). Die Regulation der genannten Entwicklungsprozesse findet über ein z. T. komplexes Netzwerk statt, wobei verschiedene Phytochrome sowie der BL-Rezeptor Cryptochrom beteiligt sein können (Quail, 2002; Sullivan und Deng, 2003).

Die Sequenzierung bakterieller Genome zeigte, dass Phytochrome phylogenetisch älter sind als bisher angenommen. Phytochrome und phytochromähnliche Proteine wurden in verschiedenen Cyanobakterienspezies sowie in nichtphotosynthetischen Eubakterien wie *Agrobacterium tumefaciens*, *Deinococcus radiodurans* und *Pseudomonas aeruginosa* (Karniol und Vierstra, 2003; Davis *et al.*, 1999) gefunden. Aufgrund des einfachen Zellaufbaus von Prokaryoten ist eine mit den Pflanzenphytochromen vergleichbare Rolle der bakteriellen Phytochrome bzw. phytochromähnlichen Proteine nicht zu erwarten. Montgomery und Lagarias (2002) formulierten die Hypothese, wonach Phytochrome aus Vorläuferproteinen mit einer Funktion als Bilinsensor entstanden sind. Einige Vertreter der bakteriellen Phytochrome und phytochromähnlichen Proteine könnten somit keine oder zumindest nicht eine alleinige Funktion als Lichtsensor haben.

Das Genom von *Synechocystis* enthält die ORFs slr0473 (*cph1*) und slr0821 (*cph2*), für deren Genprodukte die phytochromkennzeichnenden Eigenschaften, wie die Bindung eines linearen Tetrapyrrols und die Photokonversion zwischen zwei Konformationen nach der Einstrahlung von RL oder FRL, nachgewiesen werden konnten (Hughes *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2000; Wu und Lagarias, 2000). Um die Funktion dieser beiden cyanobakteriellen Phytochrome aufzuklären, wurden deren kodierende Gene durch die Insertion von Antibiotikaresistenzgen-Kassetten inaktiviert. Weiterhin wurde eine Doppelmutante von *cph1* und *cph2* erzeugt, um eventuelle kompensatorische oder überlappende Funktionen von Cph1 und Cph2 zu erfassen. Die wichtigsten Ergebnisse aus der Charakterisierung der Phytochrommutanten sind in Abb. 29 zusammengefasst.

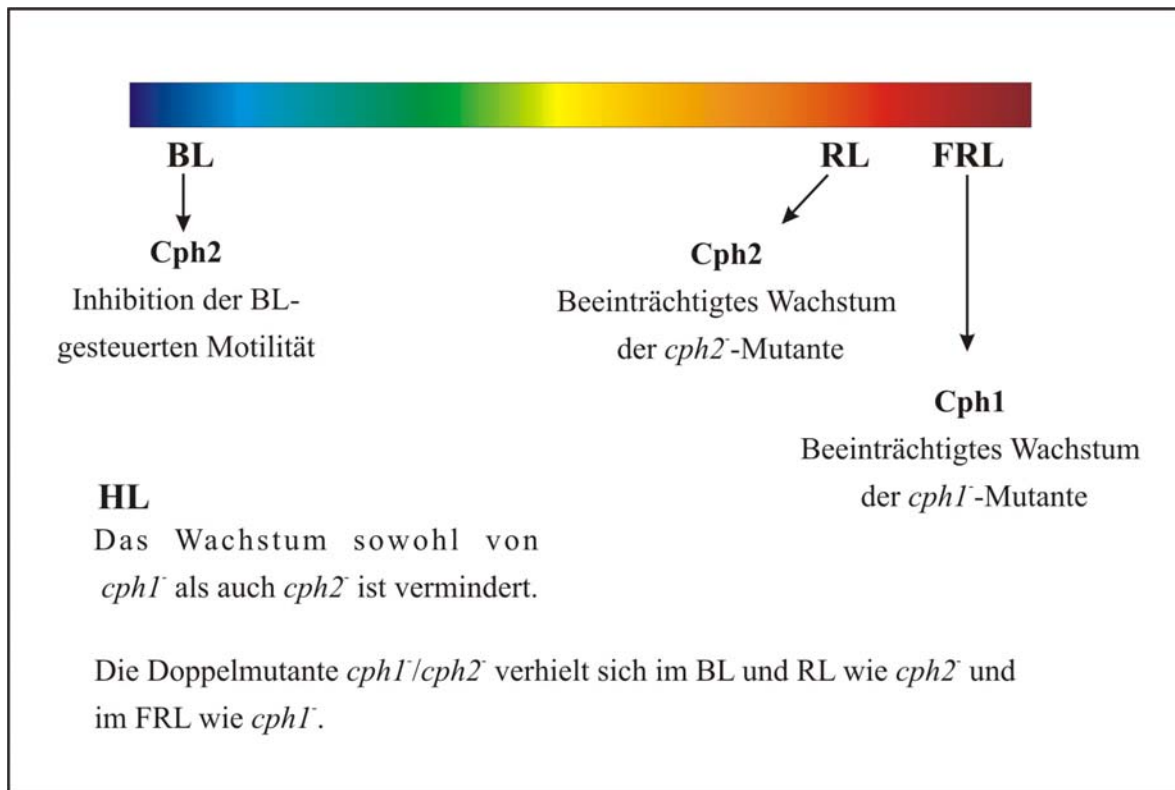


Abb. 29: Zusammenfassung der wichtigsten Resultate aus der Analyse der *cph1*- und *cph2*-Mutanten.

#### 4.1 Untersuchungen zum Wachstumsverhalten der Phytochrommutanten

Um die Auswirkungen der Inaktivierung der beiden cyanobakteriellen Phytochrome in *Synechocystis* zu charakterisieren, wurde zunächst das Wachstum der einzelnen Phytochrommutanten sowie der Doppelmutante unter verschiedenen Lichtbedingungen untersucht. Dazu gehörten die Wachstumsanalyse unter verschiedenen Lichtintensitäten sowie Lichtqualitäten.

Die Untersuchung des Wachstums in Abhängigkeit von der Lichtqualität ergab, dass die phytochromrelevanten Spektralbereiche RL und FRL einen Einfluss auf das Wachstum der Phytochrommutanten ausübten. Hierbei verhielten sich die *cph1*- und die *cph2*-Mutante gegensätzlich: Während *cph1* unter FRL eine gegenüber dem WT verminderte Wachstumsrate vorwies, wuchs *cph2* unter RL schlechter (Abb. 10). Die Doppelmutante zeigte jeweils das gleiche Wachstumsverhalten wie die Einzelmutanten.

Wie bereits erwähnt, liegen Phytochrome in zwei Konformationen vor: Im RL dominiert die FRL-absorbierende  $P_{fr}$ -Form, die RL-absorbierende  $P_r$ -Form hingegen ist die überwiegende Konformation im FRL. Für pflanzliche Phytochrome wird angenommen, dass  $P_{fr}$  die biologisch aktive Form darstellt (Sullivan und Deng, 2003). In *Synechocystis* zeigte die  $P_r$ -Form eines rekombinanten Cph1-Proteins aus *E. coli* eine höhere Phosphorylierungsrate und Phosphatübertragung auf den Response-Regulator Rcp1 als die  $P_{fr}$ -Form des Photorezeptorproteins (Yeh *et al.*, 1997). Dies lässt vermuten, dass die  $P_r$ -Form von Cph1 die biologisch aktive Form ist. Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für die beiden Phytochrome CphA und CphB aus *Calothrix* sp. PCC 7601. Hier wurde ebenfalls die im FRL vorliegende  $P_r$ -Form von CphA und CphB stärker autophosphoryliert, wobei jedoch im Gegensatz zu Cph1 der Transfer des Phosphats vom Sensorprotein auf den entsprechenden Response-Regulator unter RL nicht aufgehoben wurde (Hübschmann *et al.*, 2001b). Unter Verwendung der Absorptionsspektren des rekombinanten, mit PCB assemblierten Cph1-Proteins (Lamparter *et al.*, 1997) wurde der Anteil der  $P_r$ -Form an der Gesamtmenge an Phytochrom unter den für diese Arbeit genutzten FRL-Bedingungen mit 90 % berechnet (unter RL 42 %). Daher ist anzunehmen, dass unter diesen Lichtbedingungen Cph1 hauptsächlich in seiner aktiven Form vorliegt. Wenn die  $P_r$ -Konformation von Cph1 die biologisch aktive Form ist, sollte sich eine Mutante mit einem inaktivierten *cph1*-Gen unter FRL anders verhalten als der WT. Dies konnte durch die Aufnahme von Wachstumskurven beobachtet werden: Die *cph1*-Mutante zeigte ein auf ca. 60 % vom WT vermindertes Wachstum im FRL, während RL keinen Einfluss auf das Wachstum von *cph1*<sup>-</sup> ausübte (Abb. 10). Auch während des kompetitiven Wachstums von WT und *cph1*<sup>-</sup> in einer Mischkultur wurden die Mutantenzellen nach 12 Tagen im FRL verdrängt. Somit sprechen die Daten aus der Wachstumsanalyse dafür, dass  $P_r$  tatsächlich die biologisch aktive Form ist. Jedoch ist nicht völlig auszuschließen, dass nicht auch die  $P_{fr}$ -Form von Cph1 am Beginn einer weiteren Signalkette stehen könnte. So existieren für pflanzliche Phytochrome Hinweise, dass die als biologisch inaktiv geltende Konformation, hier die  $P_r$ -Form, auch eine biologische Aktivität besitzen könnte (Reed, 1999; Shinomura *et al.*, 2000). Resultate aus der Untersuchung der phytochromgesteuerten Hypokotyl-Elongation bei *A. thaliana* deuten auf eine Funktion der photozyklisierten  $P_r$ -Form von PhyA (Shinomura *et al.*, 2000), d. h. die neu synthetisierte Grundform  $P_r$  muss eine Photokonversion in die  $P_{fr}$ - und zurück in die  $P_r$ -Form vollzogen haben.

Ein umgekehrtes Wachstumsverhalten zeigte die *cph2*-Mutante. Diese wuchs unter RL-

Bedingungen schlechter, während das Wachstum im FRL nicht beeinträchtigt war (Abb. 10). Auch während des kompetitiven Wachstums von WT und *cph2*<sup>-</sup> im RL nahm eingigen Tagen der Anteil der Mutantenzellen im Vergleich zum WT ab (Abb. 11D). Dies spricht dafür, dass die im RL dominierende P<sub>fr</sub>-Form von Cph2 die biologisch aktive Konformation ist, so wie es für pflanzliche Phytochrome angenommen wird. Das Ausmaß der Wachstumsreduktion (ca. 80 %) war geringer ausgeprägt als bei der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante im FRL (ca. 60 %). Eine mögliche Ursache hierfür könnte im verhältnismäßig niedrigen Anteil von Cph2 in seiner P<sub>fr</sub>-Form unter unseren RL-Bedingungen zu suchen sein. Der P<sub>fr</sub>-Anteil wurde für die in dieser Arbeit beschriebenen RL-Bedingungen mit 58 % berechnet. Allerdings bezieht sich dieser Wert auf das Absorptionsspektrum des rekombinanten, mit PCB assemblierten Cph1-Proteins aus *E. coli*, welches dem Spektrum eines in *Synechocystis* überexprimiertem Cph1 entsprach (Hübschmann *et al.*, 2001a). Die Absorptionseigenschaften des nativen Cph2 müssen nicht dem von Cph1 entsprechen. Vielmehr weisen bisherige Daten aus der spektrophotometrischen Analyse eines in *E. coli* rekombinant exprimierten Cph2-Proteins mit PCB als Chromophor auf eine Verschiebung der Maxima von P<sub>fr</sub> und P<sub>r</sub> um ca. 10 bzw. 16 nm in den kürzeren Wellenlängenbereich gegenüber Cph1 hin (Wu und Lagarias, 2000; Park *et al.*, 2000). Dies würde bedeuten, dass der tatsächliche Anteil der P<sub>fr</sub>-Form des Cph2-Photosensors höher gewesen sein kann. Eine genaue Berechnung des P<sub>fr</sub>- und P<sub>r</sub>-Anteils des Cph2-Proteins unter den untersuchten Lichtbedingungen war nicht möglich, da entsprechende Daten nicht verfügbar waren. Über die Natur des Chromophors und die Absorptionscharakteristika des nativen Cph2-Proteins ist bisher nichts bekannt.

Das Vorhandensein von zwei Phytochromen (*AtBphP1*, *AtBphP2*) mit gegensätzlichen photobiologischen Eigenschaften konnte für *Agrobacterium tumefaciens* beschrieben werden (Karniol und Vierstra, 2003). Die Analyse der rekombinanten Phytochrom-Proteine aus *Agrobacterium tumefaciens* deutete darauf hin, dass die Grundform von *AtBphP1* der P<sub>r</sub>-Form und die von *AtBphP2* der P<sub>fr</sub>-Konformation entspricht. Beide Sensorproteine sind Histidinkinasen. Während die P<sub>r</sub>-Form von *AtBphP1* eine höhere Histidinkinase-Aktivität besaß als die P<sub>fr</sub>-Form, wurde für *AtBphP2* eine höhere Histidinkinase-Aktivität der P<sub>fr</sub>- im Vergleich zur dazugehörigen P<sub>r</sub>-Form ermittelt. Aufgrund dieser gegensätzlichen photobiologischen Eigenschaften vermuten die beiden Autoren, dass *AtBphP1* und *AtBphP2* als gegensätzliche Photorezeptoren fungieren könnten.

Die *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante wuchs sowohl im RL als auch im FRL schlechter als der



WT (Abb. 10), wobei sich das Ausmaß der Wachstumsreduktion nicht wesentlich von den Werten für die entsprechenden Einzelmутanten unterschied. Daher lässt zumindest die Analyse des Wachstumsverhaltens der Phytochrommutanten keine kompensatorischen oder überlappenden Funktionen von Cph1 und Cph2 erkennen. Das schließt nicht aus, dass die Untersuchung anderer physiologischer Parameter zu anderen Schlussfolgerungen führen kann.

Unter HL-Bedingungen wuchsen alle Phytochrommutanten schlechter als der WT (Abb. 10), wobei das Wachstum der einzelnen Phytochrommutanten in unterschiedlichem Ausmaß betroffen war. So hatte HL auf die *cph1*<sup>-</sup>-Mutante mit einer Wachstumsreduktion von ca. 40 % gegenüber dem WT einen größeren Einfluss als auf die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante (ca. 20 % Wachstumsverminderung gegenüber dem WT). Somit scheint das Ausschalten des *cph1*-Gens einen stärkeren Effekt auf das Zell-Wachstum zu haben als das des *cph2*-Gens. Obwohl unter HL beide Einzelmутanten schlechter wuchsen, erreichte die prozentuale Wachstumsrate der *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup>-Doppelmутante keinen geringeren Wert als die der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante.

Stärkere Beeinträchtigungen des Wachstums im WL waren nur unter hohen Lichtintensitäten zu beobachten: Mit abnehmender Lichtstärke verminderte sich auch die Wachstumsreduktion, so dass unter LL-Bedingungen keinerlei Unterschiede im Wachstum von WT und Phytochrommutanten zu erkennen war. Die Wachstumsverminderung aller Phytochrommutanten unter HL-Bedingungen zeigt, dass die Inaktivierung von *cph1* und *cph2* die Fähigkeit herabsetzte, Lichtstress zu bewältigen. Hierbei spielt die Anpassung des Photosyntheseapparats an überoptimales Licht eine große Rolle (siehe Kap. 4.2).

## 4.2 Untersuchung von Photosyntheseparametern

Cyanobakterien können sich auf verschiedene Weise an überschüssiges Licht in ihrer Umgebung anpassen. Welcher Regulationsweg zur Akklimationisierung an hohe Lichtintensitäten in Phytochrommutanten von *Synechocystis* betroffen ist, konnte jedoch nicht herausgefunden werden. Problematisch für photosynthetisch aktive Organismen ist die mit steigenden Lichtintensitäten einhergehende Gefahr der verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies über den photosynthetischen Elektronentransport (Niyogi,

1999). Eine Möglichkeit, diese Gefahr zu vermindern, ist die Reduktion der lichtsammelnden Antennen sowie die verstärkte Bildung von photoprotektiv wirkenden Pigmenten. Derartige Anpassungsmechanismen konnten für den WT beobachtet werden. Dies zeigt auch, dass die für das Wachstum unter HL-Bedingungen eingesetzte Lichtmenge tatsächlich einer Stress-Situation entsprach. Laut Analyse der Pigmentzusammensetzung unterschieden sich jedoch WT und Phytochrommutanten nicht wesentlich voneinander (Tab. 10). Die Phytochrommutanten senkten den Chl-Gehalt auf einen ähnlichen Wert wie der WT. Im Gegenzug war die Chl-bezogene Karotinoidmenge wie im WT heraufgesetzt. Für das PC/Chl-Mengenverhältnis konnten ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen WT und den einzelnen Phytochrommutanten erfasst werden.

Auch im RL und FRL konnten keine wesentlichen Unterschiede im Chl-Gehalt sowie im Car/Chl- und PC/Chl-Verhältnis zwischen dem WT und den Phytochrommutanten festgestellt werden (Tab. 10). Die höchsten Chl-Mengen wurden bei den im RL gewachsenen *Synechocystis*-Zellen gemessen. Unter FRL-Bedingungen waren die ermittelten Chl-Mengen leicht reduziert. Für Cyanobakterien bedeutet FRL, erkennbar an den sehr geringen Wachstumsraten unter diesen Bedingungen, eine extreme Lichtlimitation. Unter derartigen Bedingungen müssen photosynthetisch aktive Organismen den Aufbau des Photosyntheseapparates mit dem damit einhergehenden Energieaufwand für die Syntheseschritte ausbalancieren, um genügend Energie für andere Vorgänge in der Zelle sowie die Zellteilung bereitstellen zu können. Solche Reduktionen des Photosyntheseapparates unter Lichtmangelbedingungen wurden anhand von blattflächenbezogenen Pigmentanalysen auch bei höheren Pflanzen festgestellt (Hansen *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum Chl-Gehalt unterschied sich die Chl-bezogene Karotinoidmenge nicht wesentlich von den Werten im RL. Dies zeigt, dass die Karotinoide im gleichen Ausmaß wie das Chl reduziert waren. Das gegenüber HL und RL erhöhte PC/Chl-Verhältnis im FRL lässt schlussfolgern, dass die Phycobilisomenantenne vergrößert war. Mit einer Ausdehnung der lichtsammelnden Antennen vermögen Cyanobakterien unter Lichtmangelbedingungen das wenige ankommende Licht effizienter einzufangen und an die Photosysteme weiterzuleiten (Grossman *et al.*, 1993). Ein weiteres Problem ist die im FRL verstärkt auftretende Überanregung des PSI. Die Phycobilisomen übertragen die Anregungsenergie hauptsächlich auf das PSII (Grossman *et al.*, 1993). Mit der Vergrößerung der bei ca. 630 nm absorbierenden Phycobilisomen versuchen Cyanobakterien eine mögliche Ungleichverteilung der Elektronen über die Elektronentransportkette zu kompensieren. Im Gegensatz

zum FRL war die Phycobilisomenantenne im RL verkleinert. Hier glichen die ermittelten PC/Chl-Werte denen aus dem HL oder lagen sogar geringfügig darunter (Tab. 10).

Cyanobakterien passen sich einem ungünstigen Lichtregime auch durch Änderung der PSI/PSII-Stoichiometrie an (Fujita, 1997). So verschiebt sich im FRL das PSI/PSII-Verhältnis zugunsten des PSII, um eine Überanregung des PSI zu reduzieren. Informationen über mögliche Verschiebungen in der Stoichiometrie der Photosysteme liefert die Aufnahme von 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren, bei der die Fluoreszenz erfasst wird, die von den Chl-Molekülen in den jeweiligen *core*-Komplexen der beiden Photosysteme ausgestrahlt wird. Jedoch weisen keine der aufgenommenen 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren von WT- oder Mutantenzellen, die im HL, RL oder FRL angezogen wurden, auf eine Änderung des PSI/PSII-Verhältnisses zwischen WT oder Phytochrommutanten hin, die die Wachstumsreduktion der Mutanten unter den genannten Lichtbedingungen erklären könnte (Kap. 3.3.3.3).

Eine Verminderung des Wachstums als Folge eines beeinträchtigten Elektronenflusses über die Photosynthesekette, verbunden mit unzureichender Fixierung von anorganischem Kohlenstoff, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die für *cphI*<sup>-</sup>, *cph2*<sup>-</sup> und die Doppelmutante ermittelte Photosyntheserate, die hier als maximale Netto-Sauerstofffreisetzung gemessen wurde, hatte unter HL- und RL-Bedingungen nahezu WT-Niveau. Mögliche Unterschiede in der Photosyntheserate zwischen WT und Phytochrommutanten unter FRL-Bedingungen werden durch die sehr großen Standardabweichungen der Mittelwerte verdeckt, so dass sich hier keine eindeutige Aussage treffen lässt. Außerdem wies die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante, wie die *cphI*<sup>-</sup>- und die Doppelmutante, im FRL eine Reduktion der Chl-bezogenen maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsrates auf. Das Wachstum der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante war jedoch im Gegensatz zu den beiden anderen Mutanten im FRL nicht vermindert.

Die Sauerstoffentwicklung variierte stark zwischen den verschiedenen Lichtbedingungen. Bei den im Vergleich zum HL verringerten Werten im RL spielen sicherlich die unter RL-Einfluss erhöhten Chl-Gehalte eine Rolle, die die Bezugsgröße für die Sauerstofffreisetzung darstellen. Im FRL hingegen lagen die für diese Lichtbedingung ermittelten Werte für die maximale Netto-Sauerstofffreisetzungsrates weit über denen im HL und im RL. Da sich die Chl-Gehalte im FRL in einem Größenbereich zwischen HL und RL befinden, kann die Bezugsgröße Chl nicht als Erklärungsmöglichkeit für die hohe

Sauerstoffentwicklung im FRL dienen. Vielmehr scheinen sich andere Anpassungsprozesse vollzogen zu haben, in deren Folge die Photosynthese mit einer höheren Effizienz arbeitet. Bedenkt man den im FRL herrschenden extremen Lichtmangel, ist eine Optimierung der Photosynthese zur verbesserten Bereitstellung von Photosyntheseprodukten nachvollziehbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den verschiedenen Aspekten der Photosynthese und dem verminderten Wachstum der Phytochrommutanten unter HL-, RL- oder FRL-Bedingungen hergestellt werden konnte. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass der Einfluss von Cph1 und Cph2 auf die Photosynthese in dieser Arbeit hauptsächlich auf physiologischer Ebene untersucht wurde. In anderen Eubakterien konnte eine Funktion der bakteriellen Phytochrome bzw. phytochromähnlichen Proteine bei der Regulation der Synthese des Photosyntheseapparates oder dem Aufbau von Schutzmechanismen zur Photoprotektion nachgewiesen werden (siehe unten). In *Freymella diplosiphon*, einem Cyanobakterium mit der Fähigkeit zur komplementären chromatischen Adaptation, ist der Photorezeptor RcaE über einen Phosphorelay in die Regulation der Genexpression von Operonen involviert, welche für lichtsammelnde Proteine der Phycobilisomen kodieren (Stowe-Evans und Kehoe, 2004). Dadurch ist *Freymella diplosiphon* in der Lage, die Anteile von PC und Phycoerythrin in den Phycobilisomen in Abhängigkeit vom GL bzw. RL zu variieren und so die für die Photosynthese essentielle Lichtsammlung zu optimieren. Terauchi *et al.* (2004) demonstrierten kürzlich die Fähigkeit des RcaE-Apoproteins, einen Chromophor zu binden. Jedoch konnte keine Photokonversion des RcaE-Holoproteins aus *Freymella diplosiphon* nach Anregung mit GL oder RL gezeigt werden. In dem nichtphotosynthetischen Bakterium *Deinococcus radiodurans* steuert das Phytochrom BphP die Biosynthese des Karotinoids Deinoxanthin (Davis *et al.*, 1999). In dem symbiontisch lebenden *Bradyrhizobium* ORS278 wiesen Mutanten mit dem inaktivierten Phytochrom BrbphP, das nahe dem Photosynthese-Gencluster lokalisiert ist, einen stark reduzierten Photosyntheseapparat auf (Giraud *et al.*, 2002). Für dieses Phytochrom nehmen die Autoren an, dass die P<sub>r</sub>-Form von BrbphP als ein Antagonist für den Repressor der Genexpression des Photosynthese-Genclusters, PpsR, wirkt. Am C-Terminus befindet sich eine PAS/S-Box. Daher findet die Signalübertragung wahrscheinlich über Protein-Protein-Interaktionen statt (Giraud *et al.*, 2002). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung des Phytochroms RpBphP aus dem Purpurbakterium

*Rhodopseudomonas palustris*, welches mit *Bradyrhizobium* ORS278 nahe verwandt ist (Giraud *et al.*, 2004).

Die Wirkung der Mutation von *cph1* und *cph2* auf die Transkriptmenge ausgewählter Photosynthesegene in *Synechocystis* wurde von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe untersucht. Hier konnte jedoch kein deutlicher Einfluss der beiden Phytochrome auf das Transkriptniveau der untersuchten Gene festgestellt werden (unveröffentlichte Resultate).

Beeinflussen Cph1 und Cph2 auf irgendeine Weise die Photosynthese, sollte die Zugabe von Glukose die Beeinträchtigung des Wachstums gegenüber dem WT aufheben. *Synechocystis* kann Glukose als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen und ist dadurch zu einem Wachstum ohne Licht befähigt, wenn den Zellen ein täglicher BL-Puls gegeben wird (Anderson und McIntosh, 1991).

Im RL und FRL stimulierte die Glukosezugabe das Wachstum sowohl des WTs als auch der Phytochrommutanten (Tab. 9). Der Unterschied in der Wachstumsrate zwischen *cph2*<sup>-</sup> bzw. der Doppelmutante und dem WT wurde zwar reduziert, verschwand jedoch nicht völlig: Der durchschnittliche  $\mu$ -Wert der beiden Mutanten betrug ca. 80 % vom WT in einer glukosefreien Kultur und ca. 90 % vom WT in einer glukosehaltigen Kultur. Hierbei verhielten sich *cph2*<sup>-</sup> und die *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante gleich. Unter mixotrophen Bedingungen im FRL wuchs *cph1*<sup>-</sup> durchschnittlich mit der gleichen Geschwindigkeit wie der WT. Die Doppelmutante hingegen zeigte eine geringe Wachstumsreduktion gegenüber dem WT.

Im HL wirkte sich die Glukosezugabe negativ auf das Wachstum des WTs aus. Unter diesen Bedingungen ist Licht nicht der wachstumslimitierende Faktor. In dessen Folge herrscht bei ausreichender Versorgung mit anorganischem Kohlenstoff in der Zelle eher ein Überangebot an Zuckern. Ein Überschuss an Kohlenstoffmetaboliten bewirkt offenbar eine Runterregulierung der Photosynthese (Paul und Pellny, 2003). Diese *feedback*-Mechanismen stehen in engem Zusammenhang mit dem Kohlenstoff/Stickstoff-Balance sowie der Verfügbarkeit an anorganischem Phosphat in der Zelle.

Die durch die *Synechocystis*-Zelle aufgenommene Glukose kann entweder über die Glykolyse dem Stoffwechsel zugeführt oder zu Glykogen umgesetzt werden. Der Kohlenhydratspeicher Glykogen wird in der stationären Wachstumsphase (Lehmann und Wöber, 1976) sowie unter nährstofflimitierenden Bedingungen gebildet (Schneegurt *et al.*

1997). Die Regulation des Kohlenstoff-Stoffwechsels unter HL-Bedingungen ist für *Synechocystis* bisher nicht klar. Pelroy *et al.* (1976) analysierten am Cyanobakterium *Aphanocapsa* 6714 die Stoffwechselrouten von exogen zugefügter [ $^{14}\text{C}$ ]-Glukose. Hierbei ermittelten die Autoren, dass unter mixotrophen Bedingungen die aufgenommene Glukose zum überwiegenden Teil zu Proteinen und zum geringeren Teil in Glykogen umgesetzt wird. In *Synechocystis* sollte bei normalen Stickstoffangebot die Glukose überwiegend in den Baustoffwechsel eingeschleust werden. Inwieweit die Glukose beim WT unter HL-Bedingungen zu einer Hemmung des Wachstums führt, ist unklar.

Die Wachstumsraten von *cphI*<sup>-</sup> und *cph2*<sup>-</sup> in einer photoheterotroph im HL wachsenden Kultur entsprachen nahezu dem Wert des unter gleichen Bedingungen gewachsenen WTs (Tab. 9). Für die beiden Phytochrommutanten bedeutete die Glukosezugabe eine leichte Förderung des Wachstums gegenüber einer glukosefreien Kultur unter den gleichen Lichtbedingungen, wobei sich die stärkste Wachstumsstimulation bei der *cphI*<sup>-</sup>-Mutante beobachten ließ. Das Zusetzen von Glukose zum Medium wirkte sich zwar auch positiv auf das Wachstum der *cphI*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante aus, jedoch nicht im gleichen Maß wie bei *cphI*<sup>-</sup>.

Die wachstumsfördernde Wirkung der Glukose im HL lässt vermuten, dass die Phytochrommutanten durch die Glukosezugabe eine verminderte Energieproduktion ausgleichen können. Dies verweist auf eine mögliche Störung der Photosyntheseleistung in den Mutantenzellen. Jedoch deuten die Daten aus der Pigmentanalyse, der Aufnahme von 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren und der Bestimmung der maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsrates nicht auf eine Beeinträchtigung der Photosynthese hin.

Ist die Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff bei den Phytochrommutanten vermindert, könnten die Zellen das beim Glukoseabbau frei werdende CO<sub>2</sub> im Calvin-Zyklus nutzen. Wäre im HL die Kohlenstoffaufnahme oder die CO<sub>2</sub>-konzentrierenden Mechanismen in den Mutanten herabgesetzt, hätte sich dies in einer reduzierten maximalen Netto-Sauerstofffreisetzungsrates der Phytochrommutanten gegenüber dem WT niederschlagen müssen. Dies konnte jedoch nicht gezeigt werden. Weiterhin liegen keine Informationen über die tatsächliche Produktion von ATP und den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH sowie deren Umsetzung in den Zellen vom WT und den Phytochrommutanten vor. Yang *et al.* (2002) ermittelten eine überschüssige Produktion von NADH/NADPH in einer mixotroph unter normalen Lichtbedingungen wachsenden *Synechocystis*-Kultur. So könnte einerseits die ATP-Synthese oder die Bereitstellung an

Reduktionsäquivalenten über die Photosynthesekette in den Mutantenzellen nicht mit dem gleichen Ertrag stattfinden wie in den WT-Zellen. Andererseits könnten die Phytochrommutanten auch einen erhöhten ATP- oder NADH/NADPH-Bedarf besitzen, um durch die Mutation von *cph1* und *cph2* entstandene Effekte auszugleichen. Durch die Glukose-Zugabe würde den Mutantenzellen eine zusätzliche Möglichkeit zur ATP- bzw. NADH/NADPH-Synthese über die Glukose-Abbauwege, die in *Synechocystis* auch im Licht aktive Atmungskette (Yang *et al.*, 2002) oder einen alternativen nichtrespiratorischen Weg der Energiegewinnung zur Verfügung stehen. Ähnliches lässt sich auch zu dem photoheterotrophen Wachstum von *cph1*<sup>-</sup> und *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> im FRL sowie *cph2*<sup>-</sup> und *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> im RL sagen (Tab. 9), wobei bei der *cph2*-Mutante im RL und der Doppelmutante im HL, RL und FRL noch andere Prozesse betroffen sein müssen, da die Glukosezugabe für keine vollständige Angleichung der Wachstumsrate an die des WTs unter den genannten Kulturbedingungen sorgte.

Glukose besitzt vermutlich eine vielfältige Wirkung auf die Zelle. García-Domínguez *et al.* (2000) fanden einen Einfluss der Glukose auf die *cph1*-mRNA-Akkumulation: Der starke Anstieg der *cph1*-Transkriptmenge beim Übergang vom Licht ins Dunkel wurde durch die exogene Zugabe von Glukose vollständig aufgehoben. Somit beeinflusst die Glukose die Transkription des *cph1*-Gens oder die Stabilität der *cph1*-mRNA. Die Transkriptakkumulation von *cph1* und *cph2* in mixotroph wachsenden *Synechocystis*-Kulturen unter unseren Lichtbedingungen wurden nicht untersucht. Daher ist nicht bekannt, ob *cph1* im FRL unter Einfluss von Glukose im Medium transkribiert wird.

### 4.3 Die Lichtregulation der *cph1*- und *cph2*-Transkriptakkumulation

In dieser Arbeit wurde die lichtabhängige Akkumulation der *cph1*- und *cph2*-mRNA im WT mittels quantitativer *real time* RT-PCR untersucht. Für *cph1* konnte ein Einfluss von Lichtintensität und Lichtfarbe auf die Transkriptmenge gezeigt werden (Abb. 9A). So war die *cph1*-mRNA-Menge im HL gegenüber ML vermindert, während im Dunkeln, GL sowie im FRL ein Anstieg der Transkriptakkumulation von *cph1* gegenüber dem ML-Wert ermittelt wurde. Den stärksten Einfluss auf die *cph1*-mRNA-Menge übte HL mit 15 % und FRL mit 650 % der Transkriptmenge vom Wert unter ML-Bedingungen aus. Der Abfall der

Transkriptmenge von *cphI*<sup>-</sup> im HL könnte mit einem verminderten Bedarf des Cph1-Proteins unter dieser Lichtbedingung zusammenhängen. Jedoch wurde gerade im HL eine Wirkung der Inaktivierung des *cphI*-Gens auf das Wachstum festgestellt (Abb. 10). Die Transkriptakkumulation lässt jedoch keine Aussage über die tatsächliche Menge an Cph1-Protein in der Zelle zu. Hübschmann *et al.* (2001a) berechneten aus Absorptionsspektren 23 Moleküle Cph1 pro Zelle in einem *Synechocystis*-Stamm, der ein His-tag-Cph1-Fusionsprotein überexprimiert. Erfolgte die Expression von *cphI* unter der Kontrolle des starken, lichtregulierten *psbA2*-Promotors, wurde ein Anstieg der Cph1-Moleküle pro Zelle auf nur 200 kalkuliert, obwohl eine wesentlich höhere *cphI*-Transkriptionsmenge gemessen wurde. Diese Diskrepanz zwischen der *cphI*-mRNA-Transkriptakkumulation des unter der Kontrolle des *psbA2*-Promotors stehenden Gens und der Zahl an Cph1-Molekülen in der Zelle deuten entweder auf eine geringe Translation des Transkripts oder auf einen raschen Umsatz dieses Proteins. Hübschmann *et al.* (2001a) vermuten, dass Cph1 als Holoprotein stabil und als Apoprotein instabil sein könnte, was in diesem Fall für einen Mangel an freiem PCB für die Bindung als Chromophor sprechen würde.

Nach 1 h im Dunkeln stieg die Menge an *cphI*-mRNA in den Zellen an. Dies wurde auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt (García-Domínguez *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000). Die Zunahme der *cphI*-mRNA-Akkumulation im FRL korreliert mit dem verminderten Wachstum der *cphI*<sup>-</sup>-Mutante im Vergleich zum WT in diesem Licht (Abb. 10). Das beeinträchtigte Wachstum der *cphI*<sup>-</sup>-Mutante im FRL deutet auf eine Funktion des Cph1-Photorezeptors bei der Anpassung an eine Umgebung mit erhöhtem FRL-Anteil. Ein verstärkter Bedarf an Cph1-Protein unter diesen Lichtbedingungen ist daher denkbar. Es liegen jedoch keine Informationen darüber vor, ob der Anstieg der *cphI*-Transkriptmenge im FRL auch mit einer Zunahme an funktionstüchtigem Cph1-Protein einhergeht. Bezüglich des FRL unterscheiden sich die Resultate anderer Arbeitsgruppen von den hier vorgestellten Daten, wobei deren experimentelle Ansätze von den unsrigen abwichen. Park *et al.* (2000) konnte kein *cphI*-Transkript in einer mixotroph im FRL wachsenden Kultur finden. García-Domínguez *et al.* (2000) belichtete aus dem Dunkeln kommende Zellen mit einem kurzen FRL-Puls und ermittelte eine starke Abnahme der *cphI*-mRNA-Menge.

Auch hinsichtlich des RL-Einflusses auf die Transkriptakkumulation ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. In dieser Arbeit war nach 1 h im RL die *cphI*-Transkriptmenge



gegenüber dem Wert im ML unverändert (Abb. 9A). Park *et al.* (2000) jedoch konnten unter dieser Lichtbedingung die höchsten Signale für das *cph1*-Transkript überhaupt messen, während García-Domínguez *et al.* (2000), wie auch schon für FRL, eine drastische Abnahme der Transkriptmenge beobachteten. Letztere Arbeitsgruppe demonstrierte eine starke Lichtregulation der *cph1*-Transkriptmenge mit einer starken Zunahme im Dunkeln und einem entsprechenden Absinken des Transkripts im Licht, unabhängig von der Spektralfarbe. Hierbei spielte eine verminderte Stabilität des *cph1*-Transkripts im Licht eine Rolle. Die Autoren sehen daher eine Funktion des Cph1-Photosensors bei der Regulation von Prozessen bei Licht-Dunkel- bzw. Dunkel-Licht-Übergängen. Der Einfluss eines Kurztagsrhythmus (10 h WL, 14 h Dunkel) auf das Wachstum der Phytochrommutanten im ML wurde ebenfalls untersucht, ohne einen Unterschied zu finden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise hätten sich kurze Lichtpulse stärker auf das Wachstum der Mutanten ausgewirkt als der Kurztagsrhythmus, andererseits konnten in dieser Arbeit nicht die von García-Domínguez *et al.* (2000) beschriebenen drastischen Änderungen in der *cph1*-Transkriptakkumulation zwischen Licht und Dunkel festgestellt werden. Diese Änderungen fielen deutlich geringer aus (Abb. 9A). Auch führten García-Domínguez *et al.* (2000) keine Untersuchungen zur Menge an Cph1-Protein pro Zelle durch. Somit ist nicht bekannt, ob das *cph1*-Transkript in dem Ausmaß translatiert wurde, wie dessen Akkumulation im Dunkeln zunahm.

Neben dem Anstieg der *cph1*-mRNA-Menge im FRL und im Dunkeln wurde auch eine Zunahme des Transkripts im GL beobachtet (Abb. 9A). Der verwendete GL-Filter besitzt die Eigenschaft, im Wellenlängenbereich oberhalb von 730 nm Licht zu transmittieren. Jedoch ist die in diesem Bereich ankommende Lichtintensität sehr gering und entspricht nicht den FRL-Bedingungen, unter denen ein Anstieg des *cph1*-Transkriptniveaus gemessen wurde. Daher ist anzunehmen, dass die Zunahme der *cph1*-Transkriptakkumulation im GL nicht auf den geringen Infrarot-Anteil des GL-Filters zurückzuführen ist.

GL bedeutet für *Synechocystis* in Hinblick auf die Nutzbarkeit für die Photosynthese Schwachlicht, da in diesem Wellenlängenbereich Chl und PC kaum Licht absorbieren. Daher stellt sich die Frage, ob der Reizauslöser für den Anstieg der *cph1*-Transkriptakkumulation im GL die geringe Lichtintensität oder die Lichtfarbe Grün darstellt. Die Transkriptmenge von *cph1* unter geringen Lichtintensitäten wurde zwar nicht selbst gemessen, trotzdem ist eine erhöhte *cph1*-mRNA-Akkumulation im Schwachlicht

vorstellbar, da sich hohe Lichtintensitäten negativ und Dunkel positiv auf die Transkriptmenge auswirkten. Würde diese Erklärung zutreffen, dann müsste die photosynthetische Elektronentransportkette die *cph1*-Transkription oder die Stabilität des Transkripts beeinflussen. García-Domínguez *et al.* (2000) konnten jedoch keinen Einfluss der Inhibitoren des photosynthetischen Elektronentransports DCMU und DBMIB auf die *cph1*-Transkriptmenge feststellen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Zunahme des *cph1*-Transkriptniveaus im GL wäre ein potentieller GL-Photorezeptor. Dieser müsste einem bisher unbekannten Typ von GL-Rezeptoren angehören, da das *Synechocystis*-Chromosom im Gegensatz zu *Anabaena* sp. PCC 7120 (Jung *et al.*, 2003) kein Gen enthält, das für das Apoprotein des GL-Rezeptors Rhodopsin kodiert.

Die Analyse der lichtabhängigen *cph1*-Transkriptakkumulation deutet auf das Wirken eines oder mehrerer Photorezeptoren oder auch eines Redoxsensors hin, die zum einen die Lichtstärke zum anderen FRL und vielleicht auch GL wahrnehmen. Das Phytochrom Cph2 könnte eines dieser Photorezeptoren sein, da in der *cph2*-Mutante eine gegenüber dem WT veränderte Lichtregulation des *cph1*-Transkriptniveaus festgestellt werden konnte (Abb. 9A). Im Gegensatz zum WT wurde bei der *cph2*-Mutante kein Anstieg der *cph1*-Transkriptakkumulation nach dem Übergang von ML zum Dunkel gemessen. Dies verweist auf eine mögliche Funktion des Photorezeptors Cph2 bei der Wahrnehmung des Umweltreizes Dunkel bzw. bei der Wahrnehmung von Licht-Dunkel-Übergängen. Hierbei ist jedoch nicht bekannt, ob Cph2 die *cph1*-Transkriptakkumulation über die Stabilität des *cph1*-Transkripts oder die Transkription des *cph1*-Gens reguliert.

Die *cph2*-Inaktivierung zeigte auch einen Einfluss auf die Höhe der *cph1*-Transkriptakkumulation im GL und FRL (Abb. 9A). Unter diesen Lichtbedingungen war die beim WT beobachtete Zunahme des *cph1*-Transkriptniveaus in der *cph2*-Mutante gegenüber dem WT verringert, aber noch vorhanden. Somit spielt zwar das Cph2-Protein beim Anstieg der *cph1*-Transkriptmenge nach dem Wechsel vom ML zu GL und FRL eine Rolle, jedoch müssen weitere Photorezeptoren in die Lichtregulation der *cph1*-Transkriptakkumulation involviert sein.

Die Wirkung eines Phytochroms auf die Photoregulation der Transkriptmenge eines anderen Phytochroms konnte für PhyA und PhyB aus *A. thaliana* gezeigt werden (Cantón und Quail, 1999). Die Autoren ermittelten eine Abnahme der *phyA*-Transkriptakkumulation nach dem Übergang vom Dunkel zu RL. Diese Reduktion des *phyA*-Transkriptniveaus

verschwand jedoch in der *phyB*<sup>-</sup>-Mutante.

Im Gegensatz zu *cph1* ließ sich kein klarer Einfluss von Licht auf die *cph2*-Transkriptakkumulation erkennen (Abb. 9B). Unter den verschiedenen Lichtbedingungen fanden sich teilweise große Schwankungen in der *cph2*-mRNA-Menge zwischen den einzelnen Versuchen.

Park *et al.* (2000) fanden die höchste Menge an *cph2*-Transkript in heterotroph gewachsenen Kultur und kaum Transkript in einer mixotroph im WL gewachsenen Kultur. Unter photoheterotrophen Bedingungen im RL wurde ebenfalls eine starke Akkumulation des *cph2*-Transkripts festgestellt. Die für die Untersuchung der Lichtwirkung auf das *cph2*-Transkript gewählten Bedingungen dieser Autorengruppe sind jedoch kaum mit den hier vorgestellten Belichtungsexperimenten vergleichbar. In dieser Arbeit wurde der kurzzeitige Lichteinfluss unter photoautotrophen Kulturbedingungen auf die *cph2*-mRNA-Akkumulation untersucht und nicht der langfristige Lichteinfluss bei *Synechocystis*-Zellen mit Glukose im Anzuchtmedium.

Eine mögliche Autoregulation der *cph1*- und der *cph2*-Transkription wurde untersucht, indem die lichtabhängige Änderung der Transkriptmenge in der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante sowie in der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante analysiert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die Inaktivierung der beiden phytochromkodierenden Gene die Menge an *cph1*- bzw. *cph2*-mRNA nicht beeinflusste (Daten nicht gezeigt). Somit wird weder die *cph1*- noch die *cph2*-Transkription durch das entsprechende Phytochrom selbst reguliert. In Dikotyledonen hingegen ist das Phytochrom PhyA in die FRL-induzierte Abnahme der *phyA*-mRNA-Akkumulation involviert (Cantón und Quail, 1999).

Neben Cph2 könnten phytochromähnliche Proteine an der Regulation der *cph1*-Transkriptakkumulation beteiligt sein. Ein GL-Sensor in *Synechocystis* ist bisher nicht gefunden worden. Ein Gen, welches für das Apoprotein des GL-perzipierenden Rhodopsins kodiert, ist laut Cyanobase-Datenbank nicht vorhanden. Jedoch liegen verstärkt Hinweise auf einen bisher unbekannten potentiellen GL-Rezeptor bei Pflanzen (Folta, 2004) sowie auch bei *Synechocystis* (Choi *et al.*, 2003) vor. Auch die für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen der lichtinduzierten Motilität deuteten auf das mögliche Vorhandensein

eines GL-Sensors in *Synechocystis*. So behielten *Synechocystis*-Zellen ihre Fähigkeit zum GL zu laufen, wenn den Phototaxisplatten 10  $\mu$ M DCMU enthielten (Abb. 20B). Somit kann zumindest die lineare, photosynthetische Elektronentransportkette bei der GL-Wahrnehmung ausgeschlossen werden.

#### 4.4 Die Funktion der Phytochrome Cph1 und Cph2 in der lichtinduzierten Motilität

Studien zum Einfluss der Spektralfarbe auf die Motilität zeigten, dass *Synechocystis* eine positive Phototaxis im gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich aufwies (Choi *et al.*, 1999). Dieses phototaktische Verhalten ließ sich nicht durch Inhibitoren der Photosynthesekette hemmen. Dies deutet daraufhin, dass die Steuerung der lichtabhängigen Motilität unabhängig von der linearen photosynthetischen Elektronentransportkette wahrscheinlich durch mehrere Photorezeptoren erfolgt.

Die lichtinduzierte Motilität von *cph1<sup>-</sup>*, *cph2<sup>-</sup>* und der Doppelmutante wurde im WL sowie in verschiedenen Spektralbereichen untersucht und mit dem Verhalten des WT verglichen. Im WL bewegten sich die Phytochrommutanten wie auch der WT in Richtung Lichtquelle. Die gleichen Beobachtungen ließen sich auch für die Motilität im FRL, RL und GL festhalten (Abb. 13A-C). Somit ließ sich keine Funktion von Cph1 und Cph2 bei der Steuerung der Zellbewegung unter diesen Lichtbedingungen nachweisen.

Anders verhielten sich die *Synechocystis*-Zellen im BL. Hier konnte keine Bewegung des WT induziert werden, während die *cph2<sup>-</sup>*-Mutante in Richtung BL-Quelle lief (Abb. 13D). Die Inaktivierung des *cph1*-Gens bewirkte keine Änderung im phototaktischen Verhalten im BL gegenüber dem WT. Die *cph1/cph2*-Doppelmutante hingegen wies das gleiche Verhalten wie *cph2<sup>-</sup>* auf, d. h. die Mutantenzellen wanderten zum BL. Somit deutet die Analyse der BL-abhängigen Motilität auf eine Funktion des Photosensors Cph2 bei der Inhibierung der Bewegung von *Synechocystis*. Dieses Resultat ist insofern ungewöhnlich, da Cph2 ein echtes Phytochrom darstellt, d. h. eine RL/FRL-Photokonversion zeigt und daher wie ein pflanzliches Phytochrom als RL/FRL-Photorezeptor angesehen werden kann. Eine Erklärung des beobachteten Phänotyps von *cph2<sup>-</sup>* im BL könnte aus der für Phytochrome ungewöhnlichen Domänenarchitektur von Cph2 hervorgehen. Dieser Lichtrezeptor enthält

neben der N-terminalen Chromophorbindungsstelle eine zweite am C-Terminus (Wu und Lagarias, 2000). Diese besitzt nicht die für echte Phytochrome charakteristische Fähigkeit zur Photokonversion, entspricht also eher dem Domämentyp von phytochromähnlichen Proteinen. Stattdessen ist die Absorption dieser Bindungsdomäne mit PCB als Chromophor im blauen Wellenlängenbereich gegenüber der Absorption im roten Wellenlängenbereich deutlich verstärkt (Abb. 30A). Daraus lässt sich eine mögliche Rolle von Cph2 als BL-Rezeptor ableiten.

Die Funktion eines phytochromähnlichen Proteins als potentieller BL-Sensor konnte bereits für PlpA aus *Synechocystis* nachgewiesen werden (Wilde *et al.*, 1997). Hierbei zeigte eine Mutante mit einem inaktivierten *plpA*-Gen unter photoautotrophen Bedingungen im BL ein verzögertes Wachstum. Bei Cph2 beschränkte sich die Wirkung des BL auf die Phototaxis. Es konnten keine Wachstumsunterschiede zwischen WT und *cph2*<sup>-</sup> im BL unter photoautotrophen Bedingungen festgestellt werden (Daten nicht präsentiert).

Insgesamt konnte für das Phytochrom Cph1 keine Funktion in der lichtinduzierten Motilität nachgewiesen werden. Das Cph2-Protein hingegen besitzt eine Rolle bei der Inhibition der Zellbewegung im BL. Auf Agarplatten angezogene *Synechocystis*-Zellen zeigen oftmals eine vom Licht unabhängige Bewegung. In Phototaxisexperimenten im BL konnte eine solche Bewegung beim WT und der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante nicht beobachtet werden. Daher ist zu vermuten, dass nicht nur die Phototaxis sondern die Motilität generell inhibiert ist.

In Phototaxisexperimenten mit einer bidirektionalen Einstrahlung von BL und einer weiteren Lichtfarbe (GL, RL und FRL) ließ sich die Motilität des WT und der *cph1*<sup>-</sup>-Mutante induzieren. Dies hing jedoch vom Verhältnis von BL und der zweiten Lichtfarbe an der jeweiligen Position auf der Agarplatte ab, auf der die Zellen aufgetragen wurden. Sinkt der BL-Anteil, gewinnt der WT und *cph1*<sup>-</sup> die Fähigkeit zur lichtgerichteten Zellbewegung zurück. Hierbei spielte es keine Rolle, ob die zweite Lichtfarbe GL, RL oder FRL war (Abb. 14A-C). Zeigten der WT und die *cph1*<sup>-</sup>-Mutante an den BL-fernen Positionen Motilität, wanderten die Zellen stets in Richtung GL, RL oder FRL. Anhand der photokinetischen Reaktion der Zellen lässt sich die beobachtete Bewegung eher einer positiven Phototaxis zur GL-, RL- bzw. FRL-Quelle zuordnen als einer Fortbewegung von der BL-Quelle (negative Phototaxis): Die Zellen an der Position mit der höchsten Intensität an GL, RL oder FRL zeigten eine höhere Laufgeschwindigkeit als die an Positionen mit einer geringeren

Lichtintensität (Abb. 14A-C).

Die im BL motile *cph2*<sup>-</sup> sowie die Doppelmutante zeigten bei der bidirektionalen Einstrahlung von BL und einer weiteren Lichtfarbe eine unterschiedliche Bevorzugung der Bewegungsrichtung, die davon abhängig war, ob diese weitere Lichtfarbe GL, RL oder FRL war. In einem BL-GL- und einem BL-FRL-Feld wanderten *cph2*<sup>-</sup> und *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> zu der Lichtquelle, die den Zellen am nächsten war (Abb. 14A und C). In einem BL-RL-Feld hingegen bewegten sich die beiden Mutanten auf allen Positionen in Richtung RL-Quelle (Abb. 14B). Wurde jedoch bei einer bidirektionalen Einstrahlung von BL und RL die Intensität des RL durch eine zusätzlich angebrachte Graufolie stark reduziert, konnte Motilität bei den Zellen von *cph2*<sup>-</sup> und *cph1*<sup>-</sup>/*cph2*<sup>-</sup> induziert werden, die sich dicht an der BL-Quelle befanden (Daten nicht gezeigt). Somit zeigte die *cph2*<sup>-</sup> und die Doppelmutante eine Bevorzugung von Spektralfarben in Hinblick auf die Laufrichtung mit folgender Reihenfolge: RL, FRL und GL. Bei der Festlegung der Reihenfolge von FRL und GL wurde berücksichtigt, dass die eingestrahlte FRL-Intensität geringer war als die des GL.

#### 4.4.1 Aktionsspektrum und BL-Rezeptoren

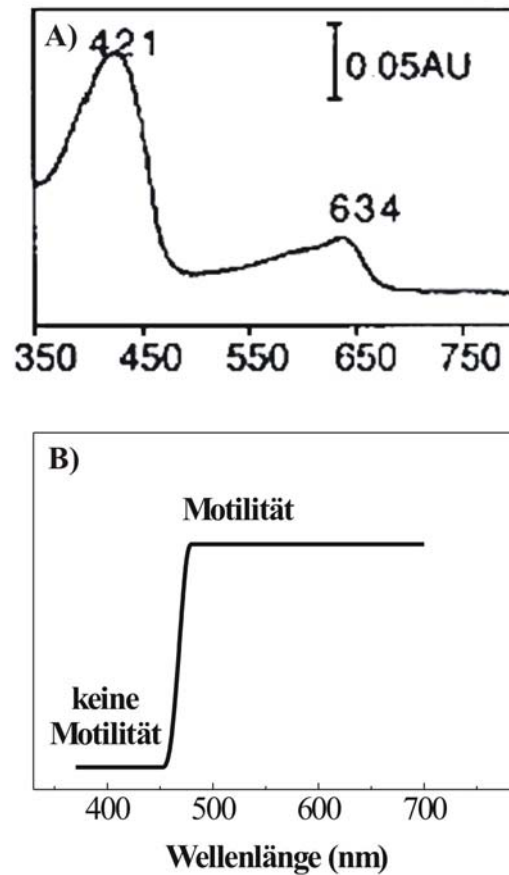
Vor einiger Zeit konnte für pflanzliche Phytochrome eine Interaktion zwischen dem RL/FRL-Lichtrezeptor Phytochrom und dem BL-Sensor Cryptochrom nachgewiesen werden (Mas *et al.*, 2000). Dieses Erkenntnis wirft die Frage auf, ob das cyanobakterielle Phytochrom Cph2 für die Inhibition der Motilität im BL verantwortlich ist, oder ob hier eine Interaktion mit einem bisher unbekannten BL-Rezeptor vorliegt. Um einer Antwort auf diese Frage näher zu kommen, wurde das Aktionsspektrum der BL-gesteuerten Motilität von WT und *cph2*<sup>-</sup> analysiert sowie die Motilität von Inaktivierungsmutanten potentieller BL-Rezeptoren in *Synechocystis* unter BL-Bedingungen untersucht.

Bisher wurden im *Synechocystis*-Genom drei verschiedene ORFs mit Sequenzähnlichkeit ihrer Genprodukte zu bekannten BL-Rezeptoren gefunden. Dazu gehören (1) sl11629 (*cry*), das ein Cryptochrom vom DASH-Typ kodiert (Hitomi *et al.*, 2000; Brudler *et al.*, 2003), (2) slr0359 (*lov*) mit einer für Phototropine charakteristischen LOV-Domäne (Crosson *et al.*, 2003) und (3) slr1694 (*bluf*), ein Vertreter der BLUF-Proteine (Masuda *et al.*, 2004).

Durch die Inaktivierung des *cph2*-Gens sind die Mutantenzellen zur Motilität im BL befähigt. Dies bedeutet, dass die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante BL wahrnehmen kann. Somit muss es einen

weiteren Lichtsensor geben, der die Phototaxis im blauen Wellenlängenbereich reguliert. Um diesen Photorezeptor identifizieren zu können, wurde die Motilität im BL von Doppelmutanten von Cph2 und jeweils einem BL-Rezeptor untersucht.

Durch die Aufnahme eines Aktionsspektrums der Motilität im blauen Wellenlängenbereich sollte ein Bezug zwischen dem Aktionsmodus des gesuchten Photorezeptors für die Inhibition der Zellbewegung zum BL und den spektralen Eigenschaften von Cph2 oder eines potentiellen BL-Rezeptoren hergestellt werden. Im Ergebnis des mit Interferenzfiltern erstellten Aktionsspektrums wies der WT im Licht mit einem Emissionsmaximum bei 461 nm und darunter keine Motilität auf (Tab. 12; Abb. 30B). Bei Verwendung von Interferenzfiltern mit einem Transmissionsmaximum bei 474 nm und darüber bewegten sich die WT-Zellen zur Lichtquelle. Dieses Aktionsspektrum ähnelt stärker dem Absorptionsspektrum der C-terminalen GAF-Domäne als dem der GAF-Domäne am N-Terminus eines rekombinanten Cph2-Proteins mit PCB als Chromophor (Abb. 30A; Wu und Lagarias, 2000). Die Absorption der N-terminalen GAF-Domäne erreicht bereits bei ca. 450 nm ein Minimum, während die Absorptionsbande der C-terminalen Domäne im blauen Wellenlängenbereich leicht in den längerwelligen Bereich verschoben ist. Allerdings beziehen sich die veröffentlichten Spektren auf ein in *E. coli* rekombinant exprimiertes Cph2-Protein. Die Absorptionseigenschaften des nativen Cph2 sind nicht bekannt. Flavoproteine, zu denen die meisten BL-Rezeptoren gehören, weisen im blauen Wellenlängenbereich eine breite Absorptionsbande auf, die bis in den blau-grünen Spektralbereich reicht. So wurde für das in *E. coli* rekombinant exprimierte BLUF-Protein aus *Synechocystis* nach einer Lichtaktivierung ein Maximum bei 457 nm mit einer Absorptionsschulter bei 483 nm beobachtet (Masuda *et al.*, 2004). Letztere entspricht einer Wellenlänge, bei der die WT-Zellen bereits eine lichtgerichtete Motilität aufwiesen. Ähnliche spektrale Eigenschaften konnten auch für ein rekombinantes Cry-Protein von *Synechocystis* beschrieben werden (Hitomi *et al.*, 2000). Somit unterstützt das Aktionsspektrum der BL-gesteuerten Motilität des WTs die Annahme, das Cph2 der Photorezeptor für die Inhibition der Zellbewegung im BL selbst ist. Das erzielte Aktionsspektrum ähnelt stärker den Absorptionseigenschaften der C-terminalen als der N-terminalen GAF-Domäne im blauen Wellenlängenbereich. Ob sich die BL-Sensor-Funktion einer der beiden Chromophorbindungsdomänen zuordnen lässt, kann nur eine Analyse der GAF-Domänen klären.



**Abb. 30: Vergleich des Absorptionsspektrums der C-terminalen GAF-Domäne mit PCB als Addukt (A) mit dem Aktionsspektrum der lichtinduzierten Motilität des WT (B).** Die Abb. 30A stammt aus der Veröffentlichung von Wu und Lagarias (2000).

Um weitere Belege zu finden, dass das Cph2-Protein der Photorezeptor für die Inhibierung der Motilität im BL ist, wurden die BL-Photorezeptoren Cry, LOV und BLUF inaktiviert. Das phototaktische Verhalten der resultierenden Mutanten im BL wurde untersucht. Hierbei verhielten sich die *cry*<sup>-</sup>-, *lov*<sup>-</sup>- und die *bluf*<sup>-</sup>-Mutanten wie der WT, d. h. sie zeigten keine Phototaxis (Abb. 23). Somit sprechen die erzielten Resultate nicht für eine Interaktion von Cph2 mit einem der getesteten, potentiellen BL-Rezeptoren bei der Vermittlung der BL-gesteuerten Motilität.

Da die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante im BL motil ist, muss in *Synechocystis* ein BL-Rezeptor vorhanden sein, der die Phototaxis im blauen Wellenlängenbereich steuert. Die Proteine Cry, LOV und BLUF zeigten hierbei keine Funktion bei der generellen BL-Wahrnehmung zur Regulation



der lichtinduzierten Motilität: Die *cry<sup>-</sup>/Δcph2<sup>-</sup>*-, *lov<sup>-</sup>/Δcph2<sup>-</sup>*- und die *bluf<sup>-</sup>/Δcph2<sup>-</sup>*-Doppelmutanten waren im BL motil, wobei die Mutation im *bluf*-Gen allerdings eine Umkehrung der Bewegungsrichtung der *bluf<sup>-</sup>/Δcph2<sup>-</sup>*-Mutantenzellen bewirkte (Abb. 23). Somit kann die *bluf<sup>-</sup>/Δcph2<sup>-</sup>*-Doppelmutante zwar noch BL wahrnehmen, jedoch ist die positive Phototaxis beeinträchtigt. Also muss es einen weiteren Photorezeptor geben, der die Lichtrichtung im BL perzipiert.

Es besteht die Möglichkeit, dass das Genom von *Synechocystis* Gene für BL-Sensoren eines bisher unbekannten Typs enthält. Viele der bisher bekannten Photorezeptoren wurden erst in den letzten 10 Jahren entdeckt. Für andere Photosensoren, wie die für UV(B)- oder GL in höheren Pflanzen, gibt es nur Hinweise auf ihre mögliche Existenz (Frohnmeier und Staiger, 2003; Folta, 2004; Briggs und Christie, 2002). Außerdem sind im *Synechocystis*-Genom laut Cyanobase-Datenbank eine ganze Reihe von ORFs vorhanden, die für hypothetische Proteine mit bisher unbekannter Funktion kodieren.

Es ist auch nicht auszuschließen, dass die ausgewählten BL-Rezeptoren überlappende Funktionen haben, so dass nach Ausschalten eines BL-Rezeptors ein anderer dessen Funktion übernimmt. In diesem Fall würde erst die Inaktivierung aller BL-Sensoren in der *cph2<sup>-</sup>*-Mutante die Motilität im BL beeinträchtigen.

Der Einfluss des Photosyntheseinhibitors DCMU auf die Motilität von WT und der *cph2<sup>-</sup>*-Mutante im BL wurde untersucht. Eine Motilität des WTs durch DCMU wurde im BL nicht induziert. Die *cph2<sup>-</sup>*-Mutante zeigte ein variables Verhalten, d. h. sowohl positive Phototaxis als auch eine Hemmung der Motilität wurde beobachtet (Abb. 20A). Dies deutet darauf hin, dass die photosynthetische Elektronentransportkette unter bestimmten Lichtbedingungen doch die Photobewegung der Zelle regulieren könnte. Choi *et al.* (1999) fanden keinen Einfluss von DCMU auf die lichtinduzierte Motilität. Diese Experimente wurden jedoch nur unter WL-Bedingungen durchgeführt. Daher ist es nicht auszuschließen, dass im blauen Spektralbereich die Photosynthesekette in der *cph2<sup>-</sup>*-Mutante in die Lichtwahrnehmung für die Photobewegung involviert ist. Die beobachtete Variabilität im Verhalten der *cph2<sup>-</sup>*-Mutante auf DCMU-haltigen Agarplatten im BL könnte dadurch verursacht worden sein, dass der Inhibitor DCMU nicht in allen Experimenten für eine ausreichende Blockierung des Elektronentransports zwischen PSII und dem Plastochinonpool sorgte. Eine mögliche Rolle der photosynthetischen Elektronentransportkette in der Steuerung der Motilität wurde bei dem Purpurbakterium

*Rhodospirillum centeum* festgestellt (Jiang und Bauer, 2001), wobei als Bindeglied zwischen der photosynthetischen Elektronentransportkette und der chemosensorischen Signaltransduktionskaskade vermutlich das MCP-Protein Ptr fungiert.

Möglicherweise wird in der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante das BL-Signal zur Steuerung der Photobewegung nicht durch einen BL-Rezeptor sondern durch die Photosynthesekette wahrgenommen.

#### 4.4.2 GAF-Domänen-Analyse

Die chromophorbindenden GAF-Domänen des Cph2-Proteins unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Absorptionseigenschaften im blauen Wellenlängenbereich (Wu und Lagarias, 2000). Die C-terminale GAF-Domäne mit PCB als Addukt besitzt ein Absorptionsmaximum bei 421 nm (Abb. 30A). Dahingegen ist der Absorptionsbereich der N-terminalen Domäne mit einem assembliertem PCB in Richtung UV(A)-Bereich verschoben. Die Fähigkeit eine chromophore Gruppe zu binden ist zwar bekannt, jedoch liegen keine Informationen über die Absorptionseigenschaften des nativen Proteins vor. Mit der Inaktivierung eines der beiden potentiell chromophorbindenden Cysteine sollte geklärt werden, ob sich die Funktion als BL-Sensor für die Motilität einer der beiden GAF-Domänen zuordnen lässt und ob die publizierten Absorptionseigenschaften der entsprechenden GAF-Domäne mit dem erzieltem Aktionsspektrum vergleichbar sind. Die Inaktivierung der chromophorbindenden Aminosäuren erfolgte über Austausch der Cysteine gegen eine geeignete Aminosäure durch ortsgerichtete Mutagenese. Die verschiedenen *cph2*-Varianten (*cph2*<sup>-</sup>, *GAF1*<sup>\*</sup>-, *GAF2*<sup>-</sup> und *GAF3*<sup>\*</sup>-pVZ321, siehe Abb. 16 und Abb. 17) wurden als pVZ321-Konstrukt über triparentale Konjugation in eine  $\Delta cph2$ -Mutante transferiert. Das pVZ321-Plasmid kann sich in *Synechocystis* autonom replizieren.

Während die *GAF2*<sup>-</sup> und *GAF3*<sup>\*</sup>-Transkonjuganten stets im BL motil waren, zeigten die *cph2*-Transkonjuganten ein variables Verhalten (Abb. 17B): Ein dem WT entsprechendes Fehlen der Motilität im BL wurde oftmals nur bei neu hergestellten Transkonjuganten beobachtet. Ältere Kulturen schienen diese Eigenschaften wieder zu verlieren. Auch die Analyse der *GAF1*<sup>\*</sup>-Transkonjuganten erbrachte keine klaren Resultate. Allerdings verhielten sich diese mehrheitlich wie die *cph2*-Mutante, d. h. die *GAF1*<sup>\*</sup>-Transkonjuganten waren im BL motil. Somit war eine endgültige Zuordnung der BL-Sensor-Funktion zu einer der beiden chromophorbindenden GAF-Domänen nicht möglich.

Ein pVZ321-Plasmid konnte zwar für jedes der verschiedenen *cph2*-Varianten mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 17C), jedoch erlaubt diese Methode keine Aussage darüber, ob tatsächlich in **allen** *Synechocystis*-Zellen das pVZ321-Plasmid noch vorhanden war. Wie Abb. 18 verdeutlicht, genügte schon ein geringer Anteil an *cph2*<sup>-</sup>-Zellen, um Motilität in Erscheinung treten zu lassen. Daher könnte der nichtstabile Phänotyp der *cph2*-Transkonjuganten durch einen Verlust des pVZ321-Plasmids in einem Teil der Zellen herrühren. Unabhängig davon ist bei der Interpretation der Daten zu beachten, dass der Austausch von Aminosäuren zu einer verminderten Stabilität und damit Funktionstüchtigkeit des Proteins führen kann. Aufgrund einer geringen oder überhaupt nicht vorhandenen Menge an Cph2-Protein in der Zelle, würden in diesem Fall die GAF1\*- oder GAF3\*-Transkonjuganten wie die *cph2*<sup>-</sup> im BL motil sein, obwohl die GAF1- oder GAF3-Domäne keine Rolle in der BL-Wahrnehmung zur Inhibierung der Motilität spielt.

Wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, reichte ein geringer Anteil von *cph2*<sup>-</sup>-Zellen gegenüber WT-Zellen in einer Mischkultur im BL aus, um den motilen Phänotyp der *cph2*<sup>-</sup>-Mutante dominieren zu lassen (Abb. 18). Diese Beobachtung lässt verschiedene Erklärungsmöglichkeiten zu. *Synechocystis* bildet lange Pili aus, die für die aktive Fortbewegung des Cyanobakteriums notwendig sind (Bhaya *et al.*, 2000). Der geringe Prozentsatz an motilen *cph2*<sup>-</sup>-Zellen könnte genügen, um einen Großteil der im BL nichtmotilen WT-Zellen mit Hilfe der Pili mit sich zu ziehen. Weiterhin ist es denkbar, dass *cph2*<sup>-</sup> einen unbekannten Faktor in das Medium abgibt, der Motilität bei den WT-Zellen induziert.

#### 4.4.3 Zwei Photorezeptoren vermitteln die positive Phototaxis in *Synechocystis*.

Wie bereits erwähnt, zeigten die Doppelmutanten von *cph2* und den potentiellen BL-Rezeptoren eine gerichtete Bewegung innerhalb des BL-Gradienten. Interessanterweise wanderten die Zellen der *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*-Doppelmutante von der Lichtquelle weg, während *cry*<sup>-</sup>/*Δcph2* und *lov*<sup>-</sup>/*Δcph2* sich zum Licht bewegten. Somit scheint das BLUF-Protein in *Synechocystis* wie PixJ1 eine Rolle bei der Vermittlung der positiven Phototaxis auszuüben. Die Funktion des phytochromähnlichen Proteins PixJ1 in der Steuerung der positiven Phototaxis wurde durch Yoshihara *et al.* (2000) und Bhaya *et al.* (2001a) nachgewiesen. Über das BLUF-Protein aus *Synechocystis* ist wenig bekannt. Das Protein wurde

spektroskopisch durch Masuda *et al.* (2004) charakterisiert. Eine mögliche Funktion des BLUF-Proteins in der Steuerung der positiven Phototaxis wurde durch eine japanische Arbeitsgruppe in Form eines Kongressbeitrags beschrieben (Okajima *et al.*, 2003).

Die Wirkung der *pixJ1*-Inaktivierung auf die lichtinduzierte Motilität von *Synechocystis* wurde in dieser Arbeit ebenfalls untersucht. Hier interessierte besonders das phototaktische Verhalten von *pixJ1*<sup>-</sup>- und *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Mutanten im BL, da in diesem Spektralbereich sich die WT-Variante aus unserer Arbeitsgruppe in Hinblick auf die Motilität anders verhielt als andere WT-Varianten von *Synechocystis* (siehe Kap. 3.5.1). Dabei stellte sich die Frage, ob sich im BL durch die *pixJ1*-Mutation negative Phototaxis in unserem WT induzieren lässt. Unter BL-Bedingungen war jedoch die *pixJ1*<sup>-</sup>-Mutante wie der WT nicht motil (Abb. 24B). Die *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante hingegen zeigte negative Phototaxis. Somit ist die inhibierende Wirkung des Lichtsensors Cph2 auf die Motilität im BL stärker als die Wirkung des PixJ1-Photorezeptors. Unter den Bedingungen WL, FRL, RL und GL zeigten die *pixJ1*<sup>-</sup>- und *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Mutanten die in der Literatur beschriebene negative Phototaxis (Tab. 14).

Ng *et al.* (2003) beschrieben detaillierte Aktionsstudien zur Auswirkung der *pixJ1*<sup>-</sup>-Inaktivierung auf die Motilität der Zellen. Auch hier ließ sich negative Phototaxis der Mutanten über nahezu den gesamten sichtbaren Spektralbereich beobachten, wobei die Mutantenzellen am stärksten auf monochromatisches Licht von 475 nm reagierten. Der PixJ1-Photorezeptor weist für phytochromähnliche Proteine insofern ungewöhnliche spektrale Eigenschaften auf, als dass dieser Lichtsensor zu einer Photokonversion zwischen einer BL-absorbierenden und einer GL-absorbierenden Form befähigt ist (Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Aufgrund der Daten aus der Charakterisierung des PixJ1-Proteins schließen die Autoren auf eine Funktion von PixJ1 als BL-Rezeptor. Dies widerspricht der Interpretation des Aktionsspektrums des Motilitätsverhaltens der *pixJ1*<sup>-</sup>-Mutante von Ng *et al.* (2003), die PixJ1 als einen RL-Rezeptor verstehen. Somit hat die GL/BL-Photokonversion möglicherweise keine Bedeutung für die Regulation der positiven Phototaxis durch das PixJ1-Protein.

Die Inaktivierung des *pixJ1*-Gens erbrachte im BL das gleiche Resultat wie die

Mutagenisierung des *bluf*-Gens, d. h. die Einzelmutanten waren im BL nicht motil, während die *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>- und *pixJ1*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Doppelmutanten negative Phototaxis zeigten (Abb. 23B und Abb. 24B). Vermutlich wirkt der Lichtsensor BLUF nicht über die gleiche Signaltransduktionskette wie PixJ1, da sich *bluf*<sup>-</sup> und *pixJ1*<sup>-</sup> im GL und FRL unterschiedlich verhielten. Während sich beide Photorezeptormutanten im RL von der Lichtquelle fortbewegten, war eine negative Phototaxis der *pixJ1*<sup>-</sup>-Mutante, aber keine Motilität oder nur eine geringe positive Phototaxis der *bluf*<sup>-</sup>-Mutanten im GL und FRL zu beobachten (Tab. 14). Hierbei ist es jedoch möglich, dass höhere Intensitäten von GL bzw. FRL ebenfalls eine negative Phototaxis der *bluf*<sup>-</sup>-Mutanten induzieren könnten.

Über welchen Mechanismus das BLUF-Protein aus *Synechocystis* wirken könnte, ist nicht bekannt. Dieser BL-Rezeptor besteht weitgehend nur aus der BLUF-Domäne. Daher ist von einer Interaktion mit einem weiteren Protein auszugehen. Das Wirkungsspektrum der *bluf*-Mutation erstreckte sich außer auf BL auch auf GL, RL und FRL. Dies deutet neben einer BL-Sensor-Funktion auch auf eine GL/RL/FRL-Sensor-Funktion des BLUF-Proteins hin. Das BLUF-Protein absorbiert Licht in einem Wellenlängenbereich zwischen 330 und 500 nm (Masuda *et al.*, 2004). Somit könnte das BLUF-Protein mit einem weiteren Photorezeptor interagieren, der Licht oberhalb einer Wellenlänge von 500 nm perzipiert.

Interessanterweise sind RL und BL, in welchem die *bluf*<sup>-</sup>- und *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Mutante negative Phototaxis zeigten, die Lichtfarben, die am besten von der Photosynthesekette verwertet werden können. Dahingegen waren die *bluf*<sup>-</sup>-Mutante und die *bluf*<sup>-</sup>/*Δcph2*<sup>-</sup>-Doppelmutante im GL und FRL, Lichtfarben mit einer geringen Nutzbarkeit in der Photosynthese, nicht motil oder wiesen eine geringe positive Phototaxis auf. Dies weist auf eine Rolle der Photosynthesekette in der lichtinduzierten Motilität hin. Choi *et al.* (1999) dokumentierten jedoch anhand von Phototaxisexperimenten mit den Inhibitoren der Photosynthesekette DCMU und DBMIB, dass die Elektronentransportkette nicht in der Steuerung der lichtvermittelten Motilität involviert ist.

Interessanterweise befindet sich in der unmittelbaren Umgebung des *bluf*-Gens der ORF slr1697 (Abb. 23A), der für die Serin/Threonin-Proteinkinase SpkB kodiert. Kamei *et al.* (2003) demonstrierten, dass das zur Pkn2-Unterfamilie gehörende SpkB-Protein für die

Motilität der Zellen notwendig ist. Mutanten mit einem inaktiviertem *spkB*-Gen zeigten nur noch eine sehr schwache Phototaxis. Die Bildung der für die Motilität essentiellen langen Pili war nicht gestört. SpkB ist nicht die einzige Serin/Threonin-Proteinkinase mit Funktion in der Motilität. Dem Genprodukt von *slr1443* (SpkE) wird eine Rolle bei der post-translationalen Modifikation des Pilin-Peptids zugeschrieben (Kim *et al.*, 2004). Wie SpkB beeinflusst auch SpkA die Motilität, ohne die Biogenese der langen Pili zu beeinträchtigen (Kamei *et al.*, 2001). Der ORF *slr1693*, der direkt vor dem *bluf*-Gen liegt, kodiert für einen Response-Regulator der PatA-Unterfamilie. Die Gene *slr0038* und *slr1041*, die für andere Response-Regulatoren dieses Typs in *Synechocystis* kodieren, sind Bestandteile von Gen-Clustern, deren Produkte in die Steuerung der positiven Phototaxis bzw. in die generelle Motilität involviert sind (Yoshihara *et al.*, 2002). Ob der PatA-Response-Regulator Slr1693 ebenfalls eine Rolle in der Regulation der lichtinduzierten Zellbewegung spielt, ist nicht bekannt. Ist dies jedoch der Fall, könnte das beobachtete Verhalten der *bluf*<sup>-</sup>-Mutante im BL, GL, RL und FRL auf einen polaren Effekt durch die Insertion der Antibiotikaresistenzgen-Kassette in das *bluf*-Gen zurückzuführen sein, wodurch die Transkription des Gens *slr1693* beeinträchtigt wäre. Ein polarer Effekt auf *slr1697* kann ausgeschlossen werden, da sich zwischen diesem Gen und *slr1694* ein weiteres Gen befindet, das für eine Phenylalanyl-tRNA-Synthetase kodiert.

#### 4.4.4 Untersuchung der TypIV-Pili

Über welchen Prozess Cph2 die lichtinduzierte Bewegung im BL inhibiert, konnte noch nicht geklärt werden. Die Zellen von *Synechocystis* bewegen sich auf festen Oberflächen auf eine Weise, die als *twitching motility* bezeichnet wird (Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Hierfür sind sogenannte TypIV-Pili notwendig (Bhaya *et al.*, 1999), wobei *Synechocystis* zwei Arten von Pili ausbildet: lange (mehr als 2 µm Länge und 6-8 nm Durchmesser) sowie in großer Zahl vorkommende kurze Pili (2-3 nm Durchmesser) (Bhaya *et al.*, 2000; Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Die Pili setzen sich aus Pilin-Untereinheiten zusammen, die durch die *pilA*-Gene kodiert werden. Bhaya *et al.* (2000) demonstrierten, dass die Inaktivierung des *pilA1*-Gens zu einem Verlust der langen Pili und einem nichtmotilen Phänotyp führt. Die Analyse der Transkriptakkumulation von *pilA1* im WT und der *cph2*-Mutante im BL und WL deutete jedoch nicht auf einen Einfluss des Photorezeptors Cph2 auf die Menge der *pilA1*-mRNA (Abb. 21).

Die Analyse von Transposonbanken (Bhaya *et al.*, 2001b) sowie eine ganze Reihe von Veröffentlichungen verweisen jedoch auf eine stetig wachsende Anzahl von Genprodukten, die auf verschiedene Weise in die Motilität involviert sind. Die genaue Wirkungsweise dieser Genprodukte in der lichtinduzierten Motilität konnte größtenteils nicht beschrieben werden, aber es werden Funktionen bei Biogenese und Steuerung der Pili sowie Funktionen in der Assemblierung der Pili und dem phototaktischen Verhalten selbst vermutet (Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Die vergleichende Untersuchung der TypIV-Pili von WT und *cph2*<sup>-</sup> mittels Elektronenmikroskopie sollte näheren Aufschluss darüber geben, ob sich der Aufbau des Bewegungsapparates vom WT im BL von dem der Mutante unterscheidet. Die elektronenmikroskopische Analyse erbrachte ein variables Ergebnis. In einem Fall besaßen die WT-Zellen unter BL-Bedingungen im Durchschnitt weniger Pili als *cph2*<sup>-</sup>. Die zu einem anderen Zeitpunkt durchgeführten Untersuchungen lieferten jedoch ein umgekehrtes Bild: Hier hatte der WT mehr Pili ausgebildet als die Mutante. Somit scheint die Ausbildung des Pili-Apparates des WT im BL nicht durch den Lichtsensor Cph2 beeinflusst zu sein. Allerdings ist bei der Interpretation dieser Daten zu berücksichtigen, dass bisher keine genauen Forschungen über den Zusammenhang von Motilität und Grad der Pilierung durchgeführt wurden. Bisher ist nur bekannt, dass sowohl das Fehlen von langen Pili als auch ein Übermaß an Pili („Hyperpilierung“) zu einem Verlust der Motilität der Zellen führt (McBride, 2001). Weiterhin konnte noch gezeigt werden, dass eine nichtmotile Mutante mit einem inaktiviertem *syacr1*-Gen, welches ein cAMP-Rezeptorprotein kodiert, eine reduzierte Anzahl von langen Pili ausbildete (Yoshimura *et al.*, 2002b).

Die vorliegenden Daten deuten zwar nicht auf einen Einfluss des Cph2-Proteins auf die Bildung der langen Pili im BL, jedoch lassen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen keinen Rückschluss auf die Funktionstüchtigkeit der Pili zu. Es wird angenommen, dass die als *twitching motility* bezeichnete Fortbewegungsweise über eine wiederholte Extension und Retraktion der TypIV-Pili abläuft. Solche Verhaltensmechanismen konnten für die Pili von *Pseudomonas aeruginosa* anhand von Videoaufnahmen visualisiert werden (Skerker und Berg, 2001). Wie bereits erwähnt, ist eine ganze Reihe von Genprodukten in den Aufbau des Pili-Apparats sowie in die Regulation der phototaktischen Bewegung involviert. Den Proteinen PilT1 und PilB1 wird eine Funktion als Motor bei der Extension und Retraktion der Pili zugeschrieben (Bhaya *et al.*, 2000;

Yoshihara und Ikeuchi, 2004). Es besteht die Möglichkeit, dass der Photorezeptor Cph2 die Aktivität dieser beiden Proteine im BL reguliert. Allerdings wiesen Mutanten mit einem inaktiviertem *pilT1*- bzw. *pilB1*-Gen einen hyperpilierten bzw. pilifreien Morphotyp auf (Bhaya *et al.*, 2000). Diese Forschungsdaten sprechen eher gegen einen Einfluss von Cph2 auf PilT1 und PilB1, da weder ein hyperpilierter noch ein pilifreier Morphotyp eindeutig für WT-Zellen im BL nachgewiesen werden konnte. Dessen ungeachtet kann die Funktionstüchtigkeit der Pili auch über andere Wege beeinträchtigt sein. Die Motilität von *Synechocystis* sowie die anderer, sich auf eine ähnliche Weise fortbewegender Eubakterien wird zwar seit einigen Jahren intensiv studiert, jedoch bestehen große Lücken im Verständnis um die molekularen Mechanismen, die hinter diesen Zellbewegungen stehen.

#### 4.4.5 Einfluss von cAMP und cGMP auf die Phototaxis

In den letzten Jahren wurden einige Forschungsergebnisse über die Rolle zyklischer Nukleotide bei der Regulation der Motilität veröffentlicht. So induzierte bei *Synechocystis* die externe Zugabe von cAMP Motilität bei einer vormals nichtmotilen Mutante mit einem ausgeschalteten *cyaI*-Gen, das eine Adenylat-Zyklase kodiert (Terauchi und Ohmori, 1999). Das cAMP-Rezeptorprotein SYCRP1 aus *Synechocystis* ist in die Biogenese der langen TypIV-Pili involviert (Yoshimura *et al.*, 2002b). In *Euglena gracilis* steuert eine photoaktivierbare Adenylyl-Zyklase mit zwei BLUF-Domänen die *step-up*-photophobische Reaktion (Iseki *et al.*, 2002).

Eine potentielle Störung von cAMP- oder cGMP-abhängigen Signalketten bei der BL-gesteuerten Motilität von WT oder *cph2*-Mutante konnte über die externe Zugabe der beiden zyklischen Nukleotide zu dem Phototaxis-Assay nicht nachgewiesen werden (Abb. 19). Terauchi und Ohmori (2004) konnten für Cya1 in *Synechocystis* zeigen, dass diese Adenylat-Zyklase für den Anstieg des cAMP-Spiegels im BL verantwortlich ist und schlussfolgern daraus, dass die Motilität im BL über eine cAMP-Signalkette mit Cya1 als Adenylat-Zyklase und SYCRP1 als potentiell Nachfolgeglied stimuliert wird. Im Gegensatz zu unserem WT war der von dieser Arbeitsgruppe verwendete WT-Stamm im BL motil. Dies wirft die Frage auf, ob in unserem WT die Aktivität von Cya1 im BL vielleicht durch das Cph2-Protein herabgesetzt wird. Sollte dies der Fall sein, hätte die externe Zugabe von cAMP die Motilität des WTs induzieren müssen. Das war aber in unseren Versuchen nicht der Fall. Interessanterweise fanden Terauchi und Ohmori (2004) nur eine Änderung



des cAMP-Spiegels nach dem Wechsel von Dunkel nach BL, nicht jedoch nach dem Wechsel ins RL oder FRL. Im Gegensatz dazu beschrieben Ohmori *et al.* (2002) für *Anabaena cylindrica* einen reversiblen Abfall bzw. Anstieg des cAMP-Gehaltes nach Belichtung mit RL bzw. FRL, was die Autoren auf eine mögliche Wirkung eines Phytochroms zurückführen. Für *Synechocystis* ist bekannt, dass die in den verschiedenen Laboratorien weltweit für Forschungszwecke genutzten WT-Stämme nicht mehr genetisch einheitlich sind (Ikeuchi und Tabata, 2001). Es ist somit nicht auszuschließen, dass *Synechocystis*-Stämme existieren, die eine andere Art der Lichtregulation des cAMP-Spiegels besitzen.

Ebenso wie cAMP lieferte die externe Zugabe von cGMP zum Phototaxis-Assay keinen Hinweis auf eine Verschiebung des cGMP-Spiegels zwischen WT und *cph2<sup>-</sup>* unter BL-Bedingungen. Beide zeigten jeweils das gleiche phototaktische Verhalten wie im Assay ohne zusätzliches cGMP. Die bisher einzige bekannte Guanylat-Zyklase in *Synechocystis* ist Cya2 (Ochoa *et al.*, 2000). Eine Rolle von cGMP-abhängigen Signalketten mit regulativer Funktion bei der Motilität wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht für *Synechocystis* beschrieben. Das Vfr-Protein, ein Homolog zum cAMP-Rezeptor-Protein aus *E. coli*, reguliert in *Pseudomonas aeruginosa* u. a. das *quorum sensing* und die Motilität der Zellen (Beatson *et al.*, 2002), die wie bei *Synechocystis* über die Bewegungsweise der *twitching motility* erfolgt. Dieses Protein ist insofern interessant, als dass es die Motilität und das *quorum sensing* wahrscheinlich über unabhängige Wege durch Bindung verschiedener zyklischer Nukleotide reguliert. Im BL konnte die externe Zugabe von cAMP oder cGMP weder Motilität beim WT hervorrufen noch die Zellbewegung der *cph2<sup>-</sup>*-Zellen inhibieren.

Es ist nicht auszuschließen, dass zusätzlich zugefügtes c-diGMP entsprechende Effekte gezeigt hätte. Das Cph2-Protein enthält sogenannte GGDEF- und EAL-Domänen. Von diesen nimmt man an, dass sie eine Rolle bei der Synthese oder Spaltung von c-diGMP, einem neuartigen Effektormolekül, spielen (Galperin *et al.*, 2001). Erst kürzlich konnte für PleD, einen ungewöhnlichen Response-Regulator aus *Caulobacter crescentus* mit zwei N-terminalen Receiver-Domänen und einer C-terminalen GGDEF-Domäne, die Zyklisierung von 2 GTP-Molekülen zu c-diGMP gezeigt werden (Paul *et al.*, 2004). Dabei konnten die Autoren demonstrieren, dass die Zyklase-Aktivität eine intakte GGDEF-Domäne erfordert und GTP-spezifisch ist.

Eine Rolle von cAMP und cGMP in der Motilität im BL konnte nicht gezeigt werden. Da das Cph2-Protein zwei GGDEF-Domänen und eine EAL-Domäne besitzt, könnte der Photosensor Cph2 die Inhibition der Motilität des WT im BL über eine Änderung des c-diGMP-Spiegels in der Zelle regulieren.

#### 4.4.6 Weitere Photorezeptoren

Bereits publizierte Aktionsstudien der lichtregulierten Motilität von *Synechocystis* lassen auf das Wirken mehrerer Photorezeptoren bei der Steuerung der Zellbewegung schließen (Choi *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 2003). Zusätzlich zu den bereits erwähnten Mutanten mit inaktivierten Genen für die Phytochrome Cph1 und Cph2 sowie den potentiellen BL-Sensoren Cry, LOV und BLUF wurden weitere Mutanten mit einem Defekt in Genen erzeugt, die für phytochromähnliche Proteine kodieren.

Das phototaktische Verhalten von *plpA*<sup>-</sup>, *1473*<sup>-</sup>, *1393*<sup>-</sup>, *1969*<sup>-</sup>-Mutanten wurde in Abhängigkeit vom WL sowie von FRL, RL, GL und BL analysiert. Wie schon für *cph1*<sup>-</sup> (Abb. 13A-D), *cry*<sup>-</sup> und *lov*<sup>-</sup> (Tab. 14) konnte für diese Mutanten keine Funktion bei der Steuerung der lichtabhängigen Motilität unter den untersuchten Lichtbedingungen nachgewiesen werden (Tab. 15 und Tab. 18). Die Motilität der BL-Rezeptormutanten wurde ebenfalls im UV(A)-Licht, GL, RL und FRL getestet (Daten nicht gezeigt). Auch unter diesen Lichtbedingungen wiesen die Mutanten eine zum Licht gerichtete Bewegung auf und verhielten sich somit wie der WT. Da diese Rezeptoren wahrscheinlich nur Licht unterhalb von 500 nm absorbieren, hätte eine Änderung im Phänotyp im GL, RL und FRL auf eine Interaktion mit einem weiteren Photorezeptor verwiesen. Solche Interaktionen konnten für Cryptochrome und Phytochrome in höheren Pflanzen nachgewiesen werden (Mas *et al.*, 2000).

**Tab. 18: Funktionen echter und potentieller Photorezeptoren bei der Vermittlung der lichtinduzierten Motilität von *Synechocystis*.**

Photorezeptor	Mögliche Funktion in der Motilität	Referenz
<b>Phytochrome:</b>		

Photorezeptor	Mögliche Funktion in der Motilität	Referenz
Cph1	keine	diese Arbeit
Cph2	Inhibition der Motilität zum BL	diese Arbeit
<b>Phytochromähnliche Proteine:</b>		
PlpA	keine	diese Arbeit
	Vermittlung der positiven	Yoshihara <i>et al.</i> (2000)
PixJ1	Phototaxis	Bhaya <i>et al.</i> (2001a)
		diese Arbeit
Slr1473	keine	diese Arbeit
Slr1393	keine	diese Arbeit
Slr1969	keine	diese Arbeit
<b>Potentielle BL-Rezeptoren:</b>		
Cry	keine	diese Arbeit
LOV	keine	diese Arbeit
	Vermittlung der positiven	Okajima <i>et al.</i> (2003)
BLUF	Phototaxis	diese Arbeit

#### 4.5 Vergleich verschiedener WT-Varianten und Analyse der IS-Elemente

Der in dieser Arbeit verwendete WT-Stamm zeigte im BL keine Motilität. Diese Eigenschaft unterscheidet sich von den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen. So berichtete Choi *et al.* (1999) von einer positiven Phototaxis bei 460 nm, wobei allerdings die Geschwindigkeit der Zellen gegenüber anderen Wellenlängen herabgesetzt war. Auch der WT-Stamm aus der Arbeit von Ng *et al.* (2003) bewegte sich im BL-Feld, wobei die

Bewegungsrichtung von der Intensität des eingestrahnten BL abhing. Bei einem anderen Cyanobakterium, dem thermophilen *Synechococcus elongatus*, konnte auch bei erhöhten Lichtintensitäten keine Phototaxis im Spektralbereich zwischen 350 und 470 nm induziert werden (Kondou *et al.*, 2001). *Synechococcus elongatus* und die für diese Arbeit genutzte WT-Variante ähneln sich somit hinsichtlich ihrer im BL inhibierten Motilität, wobei jedoch noch keine Daten über das phototaktische Verhalten des hier analysierten WT bei sehr hohen BL-Intensitäten vorliegen. Von sicherlich vorhandenen Unterschieden im experimentellen Ansatz abgesehen, deutet das variable Verhalten der verschiedenen WT-Stämme von *Synechocystis* darauf hin, dass es im Verlaufe der langen Kultivierung dieses Cyanobakteriums in diversen Laboratorien zu Änderungen im Genotyp gekommen sein kann.

Das phototaktische Verhalten der in diesem Labor vorhandenen Sammlung an WT-Varianten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 wurde im BL sowie unter anderen Lichtbedingungen untersucht. Im Ergebnis dessen zeigte sich, dass einige Stamm-Varianten die Fähigkeit zur Motilität im WL verloren hatten. Weiterhin stellte sich heraus, dass von den motilen Stämmen nur der WT aus unserem Labor nicht die Fähigkeit zur lichtgerichteten Bewegung im BL besaß (Nr. 6 in Abb. 25A). Da die Inaktivierung des *cph2*-Gens in diesem WT die Phototaxis zum BL induzierte, wurde das Vorhandensein von *cph2* in den verschiedenen WT-Varianten über RFLP-Analyse geprüft. In allen WT-Varianten konnte ein Signal für *cph2* im richtigen Größenbereich registriert werden (Abb. 25B). Jedoch können über die RFLP-Analyse nur umfangreichere Änderungen im Genom erfasst werden. Punktmutationen, die zu einem Ausfall eines funktionstüchtigen Cph2-Proteins führen würden, können mit dieser Methode nur dann registriert werden, wenn sie die Erkennungsstelle des verwendeten Restriktionsenzym modifiziert haben. Das *cph2*-Gen wurde im Chromosom der WT-Variante sequenziert, die für die Inaktivierung von Cph1 und Cph2 verwendet wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Gensequenz der in der Cyanobase-Datenbank veröffentlichten Sequenz entsprach (Daten nicht gezeigt). Da kein Antikörper gegen das Cph2-Protein vorhanden war, war es nicht möglich, die Produktion des Proteins in den einzelnen *Synechocystis*-Stämmen zu testen. Weiterhin ist nicht völlig auszuschließen, dass in den im BL motilen Stämmen die von Cph2 ausgehende Signalkette aufgrund einer Mutation unterbrochen ist. Da diese Signalkette bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht aufgeklärt wurde, konnten entsprechende Untersuchungen nicht durchgeführt werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass einer der ORFs, die für potentielle BL-Rezeptoren in *Synechocystis* kodieren, in unserem WT defekt ist. Um dies auszuschließen, wurden das *cry*-, *lov*- und das *bluf*-Gen in den im BL motilen WT-Stämmen Nr. 2 und 4 inaktiviert. Da die entsprechenden Mutanten ihre Fähigkeit zur Motilität im BL behielten (Tab. 16), lässt sich ein inaktives Cry-, LOV- oder BLUF-Protein als Ursache für die fehlende Motilität in WT-Nr. 6, dem in unserer Arbeitsgruppe am intensivsten untersuchten WT, ausschließen.

Bei der Entstehung von Mutationen spielen neben externen Faktoren sogenannte IS-Elemente eine große Rolle, die über enzymatische Transpositionereignisse an einen beliebigen Ort im Genom integriert werden können. Im *Synechocystis*-Genom sind eine große Anzahl dieser IS-Elemente vorhanden, die in Abhängigkeit von ihrer Sequenz in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Ikeuchi und Tabata, 2001). Für den vollständig sequenzierten Kazusa-Stamm konnten im Vergleich zu anderen WT-Varianten bereits drei zusätzlich vorhandene IS-Elemente ermittelt werden, die alle der ISY203-Gruppe zuzurechnen sind (Okamoto *et al.*, 1999). Eines dieser IS-Elemente befindet sich im ORF *sll1473*, der für ein phytochromähnliches Protein kodiert. Die Verteilung der IS-Elemente im Genom des WTs unserer Arbeitsgruppe wurde über eine RFLP-Analyse untersucht und mit dem Bandenmuster anderer WT-Stämme verglichen. Die meisten Unterschiede wurden hierbei zwischen dem sequenzierten Kazusa-Stamm und den übrigen Stämmen gefunden. Aber auch die im BL nichtmotile WT-Variante wies mindestens eine Änderung im Genom auf (Spur Nr. 6 in Abb. 26 und Abb. 27). Hier wurde ein Teil des pSYSG-Plasmids in den Genombereich eingebaut, in dem sich die IS-Elemente des ISY100-Typs *sll1257/sll1256* befinden (Abb. 28). Die Sequenzanalyse ergab, dass sich die pSYSG-DNA unmittelbar nach dem ORF *sll1257* anschließt. Sucht man sich den Bereich auf dem pSYSG-Plasmid, der die höchste Ähnlichkeit seiner Sequenz mit der Sequenz der in das Chromosom inserierten DNA hat, findet man in direkter Umgebung ebenfalls ein IS-Element des ISY100-Typs. Somit könnte die DNA über homologe Rekombination in das Chromosom eingebaut worden sein.

In welchem Ausmaß der Einbau der Plasmid-DNA zu Fehlern in der Sequenz in dieser Genomregion führte und ob in Folge dieser Insertion das beobachtete Verhalten unseres WTs im BL auftrat, konnte noch nicht ermittelt werden. Die RFLP-Analyse des Gens *slr1336* zeigte (Abb. 27C), dass der Einbau wahrscheinlich zwischen diesem Gen und *sll1257* erfolgte (Abb. 28). Das Autoradiogramm in Abb. 27C belegt zwar, dass *slr1336* im

Chromosom der WT-Variante Nr. 6 vorhanden ist, nicht aber, ob das Gen in seiner gesamten Länge im Genom vorhanden ist. Das Gen *slr1336* kodiert für einen  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter. Moon *et al.* (2004) beschrieben den Einfluss von Kalzium in der Motilität. Wurde *slr1336* durch den Einbau der Plasmid-DNA inaktiviert, könnte dies eine mögliche Ursache für die fehlende Motilität der WT-Variante Nr. 6 im BL sein. Der Nachweis, dass die Integration der pSYSG-DNA in die Genomregion, in der sich die IS-Elemente *sll1256* und *sll1257* sowie *slr1336* befinden, der Grund für das beobachtete Verhalten unserer WT-Variante im BL ist, erfordert jedoch weitere Untersuchungen. Dies beinhaltet eine Sequenzanalyse der Insertionsregion im Genom sowie eine Inaktivierungsanalyse der betroffenen Gene in einer anderen Variante von *Synechocystis* sp. PCC 6803, die eine BL-induzierte Zellbewegung zeigte.

Neben der beschriebenen Insertion einer Plasmid-DNA in das Genom der WT-Variante Nr. 6 können weitere, noch nicht identifizierte Veränderungen im Chromosom dieses WTs entstanden sein, die die tatsächliche Ursache für die fehlende Photobewegung unserer WT-Variante im BL ist. Derzeit wird versucht, diesen Ort über Komplementation mit einer Cosmidbank zu lokalisieren, die mit der genomischen DNA des Kazusa-Stamms angefertigt wurde (Shibata *et al.*, 2001). Mit der Cosmidbank, die uns von T. Ogawa zur Verfügung gestellt wurde und ein auf Tn7-basierendes Transposon mit einer Cm-Resistenzgen-Kassette enthält, wurden Zufallsmutanten in der WT-Variante unserer Arbeitsgruppe erzeugt. Derzeit werden die erzielten Klone auf ihr phototaktisches Verhalten im BL untersucht. Hierbei werden die Klone selektiert, welche sich - wie die *cph2*<sup>-</sup>-Mutante bzw. die anderen Stamm-Varianten von *Synechocystis* - in Richtung BL bewegen. Bei der anschließenden Analyse des Insertionsorts des Transposons ist sowohl der durch das Transposon unterbrochene ORF von Interesse - als mögliche Komponente der vom Cph2-Protein ausgehenden Signalkette - als auch die übrigen auf dem Cosmid befindlichen Gene, die einen defekten ORF auf dem Genom des für diese Arbeit verwendeten WTs komplementiert haben könnten. Eine genauere Zuordnung der Funktion ist nur über weitere Mutagenisierungen der entsprechenden ORFs in diesem WT möglich.

## 4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die beiden Phytochrome Cph1 und Cph2 beeinflussen das Wachstum unter bestimmten Lichtbedingungen. Die Inaktivierung des *cph1*-Gens wirkte sich negativ auf das Wachstum der Mutante im FRL aus, die Inaktivierung des *cph2*-Gens hingegen auf das Wachstum im RL. Beide Mutanten wuchsen im HL schlechter. Desweiteren ließ sich dem Cph2-Photorezeptor eine Funktion bei der Inhibierung der Motilität in Richtung BL zuordnen, da die WT-Zellen unter den in dieser Arbeit verwendeten BL-Bedingungen nicht motil waren, während die *cph2*-Mutanten eine positive Phototaxis zeigten. Diese Beobachtung konnte nicht auf eine Interaktion des RL/FRL-Sensors Cph2 mit einem bekannten BL-Photorezeptor in *Synechocystis* zurückgeführt werden, da eine Inaktivierung der BL-Sensoren (Cry, LOV, BLUF) keine Änderung im phototaktischen Verhalten im BL gegenüber dem WT bewirkte. Vielmehr waren die Daten aus der Aufnahme eines Aktionsspektrums der BL-gesteuerten Motilität mit den Absorptionseigenschaften der mit PCB assemblierten C-terminalen GAF-Domäne des Cph2-Proteins vergleichbar. Insgesamt deuten die beschriebenen Resultate auf eine mögliche duale Funktion des Photorezeptors Cph2 sowohl als BL- als auch als RL-Sensor hin. Ein weiterer Photorezeptor mit einer potentiell dualen Funktion als RL/FRL- sowie BL-Sensor ist Phy3 aus dem Farn *Adiantum capillus-veneris* (Nozue *et al.*, 1998). Ob die RL- und BL-Sensorfunktion des Cph2-Photorezeptors tatsächlich auf das Vorhandensein von zwei chromophorbindenden GAF-Domänen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften zurückzuführen ist, soll in Zukunft geklärt werden. Dafür wird das inaktivierte *cph2*-Gen mit Konstrukten komplementiert, bei denen - wie bei den in dieser Arbeit beschriebenen pVZ321-Konstrukten - jeweils eines der chromophorbindenden Cysteine durch eine andere AS ausgetauscht wird. Diese Varianten des *cph2*-Konstrukts werden in das Chromosom integriert. Dadurch werden stabilere Phänotypen bei der Untersuchung der BL-gesteuerten Motilität erwartet. Weiterhin soll mit diesen Mutanten das Wachstum im RL analysiert werden.

In Zukunft werden die spektralen Eigenschaften eines in *Synechocystis* überexprimierten Cph2-Proteins analysiert und mit den Eigenschaften von rekombinant in *E. coli* exprimierten Cph2-Holoproteinen verglichen. Dadurch soll die Natur des Chromophors (oder der Chromophoren) des nativen Cph2-Proteins charakterisiert werden. Wie bereits erwähnt, konnte kürzlich eine c-diGMP-Zyklase-Aktivität der GGDEF-Domäne des Response-Regulators PleD gezeigt werden (Paul *et al.*, 2004). Tischler und Camilli (2004)

demonstrierten für Inaktivierungsmutanten des Response-Regulators VieA in *Vibrio cholerae*, dass dieses Protein den c-diGMP-Spiegel in der Zelle vermindern kann. Aus diesen Daten schlussfolgerten die Autoren, dass die in diesem Response-Regulator vorhandene EAL-Domäne c-diGMP-Phosphodiesterase-Aktivität besitzt. Da das Cph2-Protein diese beiden Domärentypen enthält, liegt die Vermutung nahe, dass Cph2 die BL-gesteuerte Motilität und das Wachstum im RL über eine Modifikation des c-diGMP-Spiegels reguliert. Daher soll der Einfluss von Cph2 auf die c-diGMP-Menge unter verschiedenen Lichtbedingungen, insbesondere BL, RL und FRL, untersucht werden.



## 5 LITERATUR

- Ahmad M and Cashmore AR (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366:162-166
- Ahmad M, Lin C, Cashmore AR (1995) Mutations throughout an *Arabidopsis* blue-light photoreceptor impair blue-light-responsive anthocyanin accumulation and inhibition of hypocotyl elongation. *Plant J.* 8:653-658
- Ahmad M, Jarillo JA, Smirnova O, Cashmore AR (1998) The CRY1 blue light receptor of *Arabidopsis* interacts with phytochrome A in vitro. *Mol. Cell* 1:939-948
- Anderson SL and McIntosh L (1991) Light-activated heterotrophic growth of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: a blue-light-requiring process. *J. Bacteriol.* 173:2761-2767
- Arvind L and Ponting CP (1997) The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem. Sci.* 22:458-459
- Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS (2002) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 184:3605-3613
- Beckmann M and Hegemann P (1991) In vitro identification of rhodopsin in the green alga *Chlamydomonas*. *Biochemistry* 30:3692-3697
- Bhaya D, Watanabe N, Ogawa T, Grossman AR (1999) The role of an alternative sigma factor in motility and pilus formation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3188-3193
- Bhaya D, Bianco NR, Bryant D, Grossman AR (2000) Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Mol. Microbiol.* 37:941-951
- Bhaya D, Takahashi A, Grossman AR (2001a) Light regulation of type IV-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:7540-7545
- Bhaya D, Takahashi A, Shahi P, Grossman AR (2001b) Novel motility mutants of *Synechocystis* strain PCC 6803 generated by in vitro transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 183:6140-6143
- Bhaya D (2004) Light matters: phototaxis and signal transduction in unicellular

- cyanobacteria. *Mol. Microbiol.* 53:745-754
- Bieszke JA, Braun EL, Bean LE, Kang S, Natvig DO, Borkovich KA (1999) The *nop-1* gene of *Neorospira crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archael rhodopsins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8034-8039
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole VK (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:662-666
- Bouly JP, Giovani B, Djamei, Mueller M, Zeugner A, Dudkin EA, Batschauer A, Ahmad M (2003) Novel ATP-binding and autophosphorylation activity assiated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1. *Eur. J. Biochem.* 270:2921-2928
- Braatsch S and Klug G (2004) Blue light perception in bacteria. *Photosynth. Res.* 79:45-57
- Briggs WR and Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 7:204-210
- Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H *et al.* (2003) Identification of a new cryptochrome class: structure, function, and evolution. *Mol. Cell* 11:59-67
- Butler WL, Norris KH, Siegelman HW, Hendricks SB (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45:1703-1708
- Campbell D, Hurry V, Clarke AK, Gustafsson P, Öquist G (1998) Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:667-683
- Cantón F and Quail PH (1999) Both phyA and phyB mediate light-imposed repression of PHYA gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 121:1207-1215
- Casal JJ, Davis SJ, Kirchenbauer D, Viczian A, Yanovsky MJ, Clough RC, Kircher S, Jordan-Beebe ET, Schäfer E, Nagy F, Vierstra RD (2002) The serine-rich N-terminal domain of oat phytochrome a helps regulate light responses and subnuclear localization of the photoreceptor. *Plant Physiology* 129:1127-1137
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D (1999) Cryptochromes: Blue light receptors for plants and animals. *Science* 284:760-765
- Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR, Song PS (1999) Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* 401:610-613
- Choi JS, Chung YH, Moon YJ, Kim C, Watanabe M, Song PS, Joe CO, Bogorad L, Park

- YM (1999) Photomovement of gliding cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol.* 70:95-102
- Choi JS, Ahn MC, Chung YH, Kwon O, Suh KH, Park YM (2003) Light-induced dephosphorylation of a 65-kDa protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Plant Physiol.* 160:1259-1261
- Clack T, Mathews S, Sharrock RA (1994) The phytochrome apoprotein family in *Arabidopsis* is encoded by five genes: the sequences and expression of PHYD and PHYE. *Plant Mol. Biol.* 25:413-427
- Colón-Carmona A, Chen DL, Yeh KC, Abel S (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiol.* 124:1728-1738
- Crosson S, Rajagopal S, Moffat K (2003) The LOV domain family: Photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42:2-10
- Datta N, Hedges RW, Shaw EJ, Sykes RB, Richmond MH (1971) Properties of an R Factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 108:1244-1249
- Davis SJ, Vener AV, Vierstra RD (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* 286:2517-2520
- Elich TD and Chory J (1997) Biochemical Characterization of *Arabidopsis* wild-type and mutant phytochrome B holoproteins. *The Plant Cell* 9:2271-2280
- Ermakova SY, Elanskaya IV, Kallies KU, Weihe A, Börner T, Shestakov SV (1993) Cloning and sequencing of mutant *psbB* genes of the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynth. Res.* 37: 139-146
- Fankhauser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signalling in *Arabidopsis*. *Science* 284:1539-1541
- Fankhauser C (2001) The phytochromes, a family of red/far-red absorbing photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 276:11453-11456
- Fankhauser C and Staiger D (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of endogenous clock. *Planta* 216:1-16
- Foerstendorf H, Mummert E, Schäfer E, Scheer H, Siebert F (1996) Fourier-transform infrared spectroscopy of phytochrome: difference spectra of the intermediates of the photoreactions. *Biochemistry* 35: 10793-10799
- Folta KM (2004) Green light stimulates early stem elongation, antagonizing light-

- mediated growth inhibition. *Plant Physiol.* 135:1407-1416
- Franche C and Damerval T (1988) Tests on nif probes and DNA hybridizations. In Packer L and Glazer AN (eds) *Methods Enzymol.*, vol. 167, Academic Press, Inc., USA, 803-808
- Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T, Lagarias JC (2001) Functional genomic analysis of the HY2 Family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *The Plant Cell* 13:965-978
- Frohnmeier H and Staiger D (2003) Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiol.* 133:1420-1428
- Fujita Y (1997) A study on the dynamic features of photosystem stoichiometry: Accomplishments and problems for future studies. *Photosynth. Res.* 53:83-93
- Furuya M (1993) Phytochromes: their molecular species, gene family and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:617-645
- Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiol. Lett.* 203:11-21
- García-Domínguez M, Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ (2000) Light-dependent regulation of cyanobacterial phytochrome expression. *J. Bacteriol.* 182:38-44
- Garriga P and Manyosa J (2002) The eye photoreceptor protein rhodopsin. Structural implications for retinal disease. *FEBS Lett.* 528:17-22
- Giraud E, Fardoux J, Fourrier N, Hannibal L, Genty B, Bouyer P, Dreyfus B, Vermeglio A (2002) Bacteriophytochrome controls photosystem synthesis in anoxygenic bacteria. *Nature* 417:202-205
- Giraud E, Zappa S, Jaubert M, Hannibal L, Fardoux J, Ariano JM, Boyer P, Genty B, Pignol D, Vermeglio A (2004) Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in *Rhodospseudomonas palustris*: pitfalls of using laboratory strains. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:587-591
- Gomelsky M and Kaplan S (1998) AppA, a redox reulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 273:35319-35325
- Gomelsky M and Klug G (2002) BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem.Sci.* 27:497-500
- Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG, Collier JL (1993) The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol. Rev.* 57:725-

- Häder DP (1979) Photomovement. In Haupt W and Feinleib M (eds) Physiology of movements. Encyclopedia of Plant Physiology, vol. 7, Springer Verlag Berlin, 268-309
- Hansen U, Fiedler B, Rank B (2002) Variation of pigment composition and antioxidative systems along the canopy light gradient in a mixed beech/oak forest: a comparative study on deciduous tree species differing in shade tolerance. *Trees* 16:354-364
- Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniel-Vedele F, Pratt LH (1995) The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Mol. Biol.* 29:1143-1155
- Hecht GB and Newton A (1995) Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 177:6223-6229
- Hendricks SB and Borthwick HA (1967) The function of phytochrome in regulation of plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58:2125-2130
- Hitomi K, Okamoto K, Daiyasu H, Miyashita H, Iwai S, Toh H, Ishiura M, Todo T (2000) Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucl. Acids Res.* 28:2353-2362
- Hübschmann T, Börner T, Hartmann E, Lamparter T (2001a) Characterization of the Cph1 holo-phytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 268:2055-2063
- Hübschmann T, Jorissen HJ, Börner T, Gärtner W, Tandeau de Marsac N (2001b) Phosphorylation of proteins in the light-dependent signalling pathway of a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.* 268:3383-2289
- Hughes J and Lamparter T (1999) Prokaryotes and Phytochrome. The connection to chromophores and Signaling. *Plant Physiol.* 121:1059-1068
- Hughes J, Lamparter T, Mittmann F, Hartmann E, Gärtner W, Wilde A, Börner T (1997) A prokaryotic phytochrome. *Nature* 386:663
- Huq E and Quail PH (2002) PIF4, a phytochrome-interacting bHLH factor, functions as a negative regulator of phytochrome B signalling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 21:2441-2450
- Ikeuchi M and Tabata S (2001) *Synechocystis* sp. PCC6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 70:73-83
- Iseki M, Matsunaga S, Murakami A, Ohno K, Shiga K, Yoshida K, Sugai M, Takahashi

- T, Hori T, Watanabe M (2002) A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* 415:1047-1051
- Jiang Z, Sweem LR, Rushing BG, Devanathan S, Tollin G, Bauer CE (1999) Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* 285:406-409
- Jiang Z and Bauer CE (2001) Component of the *Rhodospirillum centenum* photosensory apparatus with structural and functional similarity to methyl-accepting chemotaxis protein chemoreceptors. *J. Bacteriol.* 183:171-177
- Jorissen HJMM, Quest B, Remberg A, Coursin T, Braslavsky SE, Schaffner K, Tandeau de Marsac N, Gärtner W (2002) Two independent, light-sensing two-component systems in a filamentous cyanobacterium. *Eur. J. Biochem.* 269:2662-2671
- Jung K-H, Trivedi VD, Spudich JL (2003) Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Mol. Microbiol.* 47:1513-1522
- Kamei A, Yuasa T, Orikiwa K, Geng XX, Ikeuchi M (2001) A eukaryotic-type protein kinase, SpkA, is required for the normal motility of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 183:1505-1510
- Kamei A, Yoshihara S, Yuasa T, Geng X, Ikeuchi M (2003) Biochemical and functional characterization of a eukaryotic-type protein kinase, SpkB, in the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Curr. Microbiol.* 46:296-301
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y *et al.* (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* 3:109-136
- Karniol B and Vierstra RD (2003) The pair of bacteriophytochromes from *Agrobacterium tumefaciens* are histidine kinases with opposing photobiological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:2807-2812
- Kehoe DM and Grossman AR (1996) Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273:1409-1412
- Kim JI, Kozhukh GV, Song PS (2002) Phytochrome-mediated signal transduction pathways in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298:457-463
- Kim YH, Park YM, Kim SJ, Park YI, Choi JS, Chung YH (2004) The role of Slr1443 in pilus biogenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803: involvement in post-translational modifications of pilins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:179-186
- Kircher S, Gil P, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D,

- Adam E, Schäfer E, Nagy F (2002) Nucleocytoplasmic partitioning of the plant photoreceptors phytochrome A, B, C, D, and E is regulated differentially by light and exhibits a diurnal rhythm. *The Plant Cell* 14:1541-1555
- Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A, Lagarias JC (2001) The *Arabidopsis* *HY2* gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *The Plant Cell* 13:425-436
- Kondou Y, Nakazawa M, Higashi S, Watanabe M, Manabe K (2001) Equal-quantum action spectra indicate fluence-rate-selective action of multiple photoreceptors for photomovement of the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Photochem. Photobiol.* 73:90-95
- Kondou Y, Mogami N, Hoshi F, Kutsuna S, Nakazawa M, Sakurai T, Matsui, Kaneko T, Tabata S, Tanaka I, Manabe K (2002) Bipolar localization of putative photoreceptor protein for phototaxis in thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *Plant Cell Physiol.* 43:1585-1588
- Lagarias JC and Lagarias DM (1989) Self-assembly of synthetic phytochrome holoprotein *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5778-5780
- Lamparter T, Mittmann F, Gärtner W, Börner T, Hartmann E, Hughes J (1997) Characterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11792-11797
- Lamparter T, Michael N, Mittmann F, Esteban B (2002) Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:11628-11633
- Lapko VN, Jiang XY, Smith DL, Song PS (1999) Mass spectroscopic characterization of oat phytochrome A: isoforms and posttranslational modifications. *Protein Sci* 8:1-11
- Lehmann M and Wöber G (1976) Accumulation, mobilization and turn-over of glycogen in the blue-green bacterium *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* 111:93-97
- Lin C (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14 Suppl.:S207-S225
- Lin C and Shalitin D (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:469-496
- Liscum E and Briggs WR (1995) Mutations in the *NPH1* locus disrupt the perception of phototrophic stimuli. *Plant Cell* 7:473-485
- Liu XL, Covington MF, Fankhauser C, Chory J, Wagner DR (2001) *ELF3* encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an *Arabidopsis* PHYB

- signal transduction pathway. *Plant Cell* 13:1293-1304
- Malhotra K, Kim ST, Batschauer A, Dawut L, Sancar A (1995) Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 34:6892-6899
- Mas P, Devlin PF, Panda S, Kay SA (2000) Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* 408:207-211
- Masuda S and Bauer CE (2002) AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* 110:613-623
- Masuda S, Hasegawa K, Ishii A, Ono T (2004) Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel FAD binding fold sensor of blue-light using FAD (BLUF); Slr1694 of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* 43:5304-5313
- Mathews S and Sharrock RA (1996) The phytochrome gene family in grasses (Poaceae): A phylogeny and evidence that grasses have a subset of the loci found in dicot angiosperms. *Mol. Biol. Evol.* 13:1141-1150
- McBride MJ (2001) Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:49-75
- Moa HB, Li GF, Li DH, Wu QY, Gong YD, Zhang XF, Zhao NM (2003) Effects of glycerol and high temperatures on structure and function of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *FEBS Lett.* 553:68-72
- Montgomery BL and Lagarias JC (2002) Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* 7:357-366
- Moon YJ, Park YM, Chung YH, Choi JS (2004) Calcium is involved in photomovement of cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol.* 79:114-119
- Myers J, Graham JR and Wang RT (1980) Light-harvesting in *Anacystis nidulans* studied in pigment mutants. *Plant Physiol.* 66:1144-1149
- Nagy F and Schäfer E (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signalling pathways in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:329-355
- Ng WO and Pakrasi HB (2001) DNA photolyase homologs are the major UV resistance factors in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Gen. Genet.* 264:924-930
- Ng WO, Grossman AR, Bhaya D (2003) Multiple light inputs control phototaxis in



- Synechocystis* sp. strain PCC 6803. J. Bacteriol. 185:1599-1607
- Ni M, Tepperman JM, Quail PH (1998) PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. Cell 95:657-667
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50:333-59
- Nozue K, Kanegae T, Imaizumi T, Fukuda S, Okamoto H, Yeh KC, Lagarias JC, Wada M (1998) A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:15826-15830
- Ntefidou M, Iseki M, Watanabe M, Lebert M, Haeder DP (2003) Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. Plant Physiol. 133:1517-1521
- Ochoa de Alda JAG, Ajlani G, Houmard J (2000) *Synechocystis* strain PCC 6803 *cya2*, a prokaryotic gene that encodes a guanylyl cyclase. J. Bacteriol. 182:3839-3842
- Ohmori M, Terauchi K, Okamoto S, Watanabe M (2002) Regulation of cAMP-mediated photosignaling by a phytochrome in the cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. Photochem. Photobiol. 75:675-679
- Okajima K, Yoshihara S, Geng X, Katayama M, Ikeuchi M (2003) Structural analysis of a novel flavoprotein in Cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 44:162 (Suppl.)
- Okamoto S, Ikeuchi M, Ohmori M (1999) Experimental analysis of recently transposed insertion sequences in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. DNA Res. 6:265-273
- Otto H, Lamparter T, Borucki B, Hughes J, Heyn MP (2003) Dimerization and interchromophore distance of Cph1 phytochrome from *Synechocystis*, as monitored by fluorescence homo and hetero energy transfer. Biochemistry 42:5885-5895
- Park CM, Kim JI, Yang SS, Kang JG, Kang JH, Shim JY, Chung YH, Park YM, Song PS (2000) A second photochromic bacteriophytochrome from *Synechocystis* sp. PCC 6803: Spectral analysis and down-regulation by light. Biochemistry 39:10840-10847
- Paul MJ and Pellny TK (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. J. Exp. Bot. 54:539-547
- Paul R, Weiser S, Amiot NC, Chan C, Schirmer T, Giese B, Jenal U (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. Genes Dev. 18:715-727

- Pelroy RA, Kirk MR, Bassahm JA (1976) Photosystem II regulation of macromolecule synthesis in the blue-green alga *Aphanocapsa* 6714. J. Bacteriol. 128:623-632
- Quail PH (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? Curr. Opin. Cell Biol. 14:180-188
- Reed JW (1999) Phytochromes are P<sub>r</sub>-ipatetic kinases. Curr. Opin. Plant Biol. 5:393-397
- Rippka R, Desrullles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY (1979) Genetic assignment, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 11:1-61
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2 nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sancar A (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. Chem. Rev. 103:2203-2237
- Sanger F, Nickeln S, Coulsen AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467
- Schäfer E and Bowler C (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. EMBO reports 3:1042-1048
- Schmitz O, Katayama M, Williams SB, Kondo T, Golden SS (2000) CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. Science 289:765-768
- Schneegurt MA, Sherman DM, Sherman LA (1997) Composition of the carbohydrate granules of the cyanobacterium, *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142. Arch. Microbiol. 167:89-98
- Sengbusch P v, Bergmann R, Stader L, Eickmeier (1996) Botanik. Elektronisches Buch
- Shalitin D, Xuhong Y, Maymon M, Mockler T, Lin C (2003) Blue-light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. Plant Cell 15:2421-2429
- Shalitin D, Yang HY, Mockler TC, Maymon M, Guo HW, *et al.* (2002) Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. Nature 417:763-767
- Sharrock RA, and Quail PH (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of plant regulatory photoreceptor family. Genes Dev. 3:1745-1757

- Shibata M, Ohkawa H, Kaneko T, Fukuzawa H, Tabata S, Kaplan A, Ogawa T (2001) Distinct constitutive and low-CO<sub>2</sub>-induced CO<sub>2</sub> uptake systems in cyanobacteria: genes involved and their phylogenetic relationship with homologous genes in other organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11789-94
- Shinomura T, Uchida K, Furuya M (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122:147-156
- Sineshchekov OA, Jung KH, Spudich JL (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:8689-8694
- Singh AK, McIntyre LM, Sherman LA (2003) Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol.* 132:1825-1839
- Skerker JM and Berg HC (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6901-6904
- Smith H (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature* 407:585-591
- Spudich JL (1998) Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol. Microbiol.* 28:1051-1058
- Stowe-Evans EL and Kehoe DM (2004) Signal transduction during light-quality acclimation in cyanobacteria: a model system for understanding phytochrome-response pathways in prokaryotes. *Photochem. Photobiol. Sci.* 3:495-502
- Sullivan JA and Deng XW (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Dev. Biol.* 260:289-297
- Sweere U, Eichenberg K, Lohrmann J, Mira-Rodado V, Bäurle I, Kudla J, Nagy F, Schäfer E, Harter K (2001) Interaction of the response regulator ARR4 with phytochrome B in modulating red light signalling. *Science* 294:1108-1111
- Taylor BL and Zhulin IB (1999) PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microlbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:479-506
- Terauchi K and Ohmori M (1999) An adenylate cyclase, *cya1*, regulates cell motility in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* 40:248-251
- Terauchi K and Ohmori M (2004) Blue light stimulates cyanobacterial motility via a cAMP signal transduction system. *Mol. Microbiol.* 52:303-309

- Terauchi K, Montgomery BL, Grossman AR, Lagarias JC, Kehoe DM (2004) RcaE is complementary chromatic adaptation photoreceptor required for green and red light responsiveness. *Mol. Microbiol.* 51:567-577
- Tischler AD and Camilli A (2004) Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 53:857-869
- van der Horst MA and Hellingwerf KJ (2004) Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res.* 37:13-20
- Vierstra RD and Davis SJ (2000) Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11:511-521
- Wang H and Deng XW (2002) Phytochrome signaling mechanism. In Meyerowitz E und Somerville C (eds) *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, (<http://www.aspb.org/downloads/arabidopsis/deng.pdf>) 1-30
- Wang H, Ma L, Li J, Zhao H, Deng XW (2001) Direct interaction of *Arabidopsis* cryptochromes with COP1 in light control of development. *Science* 294:154-158
- Wilde A, Churin Y, Schubert H, Börner T (1997) Disruption of a *Synechocystis* sp. PCC 6803 gene with partial similarity to phytochrome genes alters growth under changing light qualities. *FEBS Letters* 406:89-92
- Wilde A, Fiedler B, Börner T (2002) The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol. Microbiol.* 44:981-988
- Wu SH and Lagarias JC (2000) Defining the bilin lyase domain: lessons from the extendend phytochrome superfamily. *Biochemistry* 39:13487-13495
- Yang HQ, Wu YJ, Tang RH, Liu D, Liu Y, Cashmore AR (2000) The C termini of *Arabidopsis* cryptochrome mediate a constitutive light response. *Cell* 103:815-827
- Yang C, Hua Q, Shimizu K (2002) Metabolic flux analysis in *Synechocystis* using isotope distribution from  $^{13}\text{C}$ -labeled glucose. *Metab. Eng.* 4:202-216
- Yeh KC and Lagarias JC (1998) Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:13976-13981
- Yeh KC, Wu SH, Murphy JT, Lagarias JC (1997) A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277:1505-1508
- Yoshihara S, Suzuki F, Fujita H, Geng XX, Ikeuchi M (2000) Novel putative photoreceptor and regulatory genes required for the positive phototactic movement of

- the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* *41*:1299-1304
- Yoshihara S, Geng XX, Okamoto S, Yura K, Murata T, Go M, Ohmori M, Ikeuchi M (2001) Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* *42*:63-73
- Yoshihara S, Geng X, Ikeuchi M (2002) *PilG* gene cluster and split *pilL* genes involved in pilus biogenesis, motility and genetic transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* *43*:513-521
- Yoshihara S and Ikeuchi M (2004) Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photochem. Photobiol. Sci.* *3*:512-518
- Yoshimura H, Yanagisawa S, Kanehisa M, Ohmori M (2002a) Screening for the target gene of cyanobacterial cAMP receptor protein SYCRP1. *Mol. Microbiol.* *43*:843-853
- Yoshimura H, Yoshihara S, Okamoto S, Ikeuchi M, Ohmori M (2002b) A cAMP receptor protein, SYCRP1, is responsible for the cell motility of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* *43*:460-463
- Zinchenko VV, Piven IV, Melnik VA, Shestakov SV (1999) Vectors for the complementation analysis of cyanobacterial mutants. *Russian Journal of Genetics* *35*:291-296

## **Publikationsliste**

Wilde A, Fiedler B, Börner T (2002) The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol. Microbiol.* 44:981-988

Fiedler B, Broc D, Schubert H, Rediger A, Börner T, Wilde A (2004) Involvement of cyanobacterial phytochromes in growth under different light qualities and quantities. *Photochem. Photobiol.* 79:551–555

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Börner und Dr. Annegret Wilde für die Betreuung meiner Promotionsarbeit und die stets gewährte Unterstützung, insbesondere im Kampf um Finanzmittel. Weiterhin danke ich Dr. Thomas Hübschmann und David Broc von unserer Phytochrom-Projektgruppe für ihre Diskussions- und Gesprächsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei Barabara Hickel (AG Grimm) für die technische Assistenz bei der HPLC und Dr. Heiko Lokstein (AG Grimm) für die Hilfe bei der Aufnahme von 77K-Fluoreszenz-Emissionsspektren. Dr. Gilbert Tischendorf (FU Berlin) danke ich für die Ausführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Für die Sequenzanalyse bedanke ich mich bei Dr. Martin Meixner.

Carola Emanuel danke ich für die Einführung in die quantitative *real-time* RT-PCR. Bei Jan Kehr und Holger Jenke bedanke ich mich für die Hilfe bei der Bezwingung störischer Computer. Mein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Elke Dittmann für geduldiges Zuhören und wertvolle Anregungen für meine Arbeit.

Prof. Dr. Hendrik Schubert sowie Prof. Dr. Alfred Batschauer und Dr. Tatjana Kleine gewährten mir einen interessanten und angenehmen Forschungsaufenthalt an der Universität Rostock bzw. an der Philipps-Universität Marburg. Auch ihnen gilt mein besonderer Dank.

Dr. Bernd Voigt (MBI Berlin) und Dr. Klaus Irrgang (TU Berlin) danke ich für die Bereitstellung von Interferenzfiltern.

Ich möchte mich bei allen Kollegen aus der Abteilung Genetik bedanken, insbesondere bei Yvonne Zilliges, Kristina Kühn, Tabea Börner, Petra Dreier und Jana Müller.

Schließlich bedanke ich mich herzlich bei meinen Eltern und Freunden für aufbauende Hilfe in schwierigen Momenten und geduldiges Ertragen naturwissenschaftlicher Monologe, speziell bei Antonia, Cord, Dorit, M., Ralph und Ute.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit im Fach Biologie selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Berlin, den 04.10.2004



## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Brita Fiedler  
geboren am: 05.11.1973 in Dresden

### Ausbildung

1980-1990: Besuch der Allgemeinbildenden Schule „Richard Sorge“ in Dresden  
1990-1992: Besuch des Gymnasiums „Pestalozzi“ in Dresden  
1992: Allgemeine Hochschulreife

1992-1999: Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin  
1999: Diplom zum Thema: „Pigmentausstattung und antioxidative Schutzsysteme bei *Fagus sylvatica* und *Quercus petraea* in Anpassung an die Lichtverfügbarkeit“

Jan. - März 2000: wissenschaftliche Mitarbeit im Projekt „Phytochrom und phytochromähnliche Proteine von *Synechocystis* sp. PCC 6803“ an der Abteilung Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin

Apr. 2000 - März 2002 Stipendiatin der Fazitstiftung

Apr. 2002 - März 2003 Stipendiatin des Berliner Förderungsprogramms zur Chancengleichheit für Frauen in der Wissenschaft

seit Apr. 2003 wissenschaftliche Mitarbeit im Projekt „Funktionelle Analyse des Phytochroms Cph2 aus *Synechocystis* sp. PCC 6803“ an der Abteilung Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin